

Étude de la biologie cellulaire du facteur autocrine de motilité et de la fibronectine

par

Annik Lagana

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophia Doctor (Ph D)

en Biologie cellulaire

Avril 2005

© ANNIK LAGANA, 2005

Université de Montréal

Faculté des études supérieures



W

4

U58

2005

V. 090

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Étude de la biologie cellulaire du facteur autocrine de motilité et de
la fibronectine

Présentée par :

Annik Lagana

a été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur: Mikael Buschmann, Ph.D.

Directeur de recherche: Ivan Robert Nabi, Ph.D.

Membre du jury: Yves St-Pierre, Ph.D.

Examineur externe: Nathalie Rivard, Ph.D.

Représentant du doyen de la FES: Gerardo Ferbeyre, Ph.D.

Thèse acceptée le 18 avril 2005



RÉSUMÉ

La matrice extracellulaire (MEC) joue un rôle très important dans la métastase. Elle est impliquée, entre autre, dans la migration des cellules tumorales qui quittent la tumeur primaire et elle permet de stocker et de réguler l'activité des cytokines qui stimulent la croissance et l'angiogenèse des tumeurs. L'AMF/PGI et son récepteur, gp78/AMF-R, ainsi que la galectine-3 et le produit du gène Mgat5, GlcNAc-TV, sont fortement exprimés par les cellules tumorales et régulent l'adhésion, la migration et l'angiogenèse. Nous avons étudié la relation entre ces protéines et la matrice de fibronectine (FN).

La transformation des cellules est associée à la surexpression et à la sécrétion de l'AMF/PGI. Nous avons déterminé que la sécrétion de l'AMF/PGI-HA constituait 0.1 à 1% de la quantité totale exprimée par les cellules, la première étude quantitative de la sécrétion de l'AMF par des cellules transformées. Ensuite, nous avons démontré que l'expression de l'AMF/PGI-HA était entièrement cytosolique et qu'elle se concentrait au niveau des régions motiles riches en actine des cellules, les lamellipodes, de façon dépendante de l'activité glycolytique des cellules. L'AMF/PGI stimule la motilité des cellules tumorales de deux manières: la première grâce à la liaison de l'AMF/PGI à son récepteur et la seconde par l'apport localisé d'énergie dans les lamellipodes des cellules.

Ensuite, nous avons examiné la nature et la spécificité de l'association de l'AMF/PGI avec la matrice de FN. Nous avons déterminé que l'AMF/PGI endocytée par la voie des vésicules recouvertes de clathrine pouvait être soit

réendocyté, après son recyclage à la surface des cellules, ou s'associer aux fibrilles de FN via son récepteur. De plus, à pH acide, l'AMF/PGI pouvait s'associer directement à la FN ou à un HSPG exprimé à la surface des cellules. Ce travail a permis de mieux comprendre le rôle de la FN dans la régulation de l'endocytose de l'AMF/PGI/AMF-R et de mettre en évidence qu'à un pH acide, l'AMF/PGI peut être séquestrée dans la MEC par la FN et à la surface des cellules en se liant à un HSPG.

Enfin, l'étude des cellules tumorales épithéliales mammaires PyMT Mgat5, a montré que l'expression de Mgat5 et de la galectine-3 était impliquée dans le remaniement de la matrice de FN via l'activation de la motilité, de la FAK et de la PI3-K. De plus, nous avons observé que l'effet de la galectine-3 est amplifié par la coincubation de la galectine-3 avec le peptide RGD, qui fait compétition à la liaison des intégrines $\alpha 5 \beta 1$ avec la FN. Le rôle de la galectine-3 dans le remaniement de la matrice de FN constitue une nouvelle fonction pour cette lectine dans la motilité des cellules tumorales.

Ce travail ouvre de nouvelles avenues dans la compréhension du rôle de l'interaction de l'AMF/PGI et de la galectine-3 avec la MEC dans la progression du cancer.

MOTS CLÉ:

Phosphoglucose isomérase, Galectine-3, GlcNAc-TV, Héparane sulfate, Glycosylation, Motilité cellulaire, Glycolyse, Endocytose, Intégrine- β 1, Mgat5.

SUMMARY

The extracellular matrix (ECM) plays a very important role in cancer metastasis. It is involved in the migration of tumoral cells from the primary tumor and enables storage and regulation of cytokine activity which in turn stimulates growth and angiogenesis of tumors. AMF/PGI, its receptor gp78/AMFR, galectin-3 and the Mgat5 gene product GlcNAc-TV are all highly expressed by tumor cells and together regulate their adhesion, migration and angiogenesis. We studied the relationship between these proteins and the fibronectin (FN) matrix.

Cell transformation is associated with the overexpression and secretion of AMF/PGI. We determined that AMF/PGI-HA secretion constitutes 0.1 to 1% of total cell expression over 24 hours, this being AMF/PGI-HA expression is cytosolic and concentrates within lamellipodia, actin rich motile regions of the cells. The lamellipodial expression of AMF/PGI-HA is dependent on the cell's glycolytic activity. AMF/PGI therefore stimulates tumoral cell motility through two pathways: first by binding to its receptor and second by the localised supply of energy into lamellipodia.

We then examined the nature and specificity of AMF/PGI association with the FN matrix. We determined that AMF/PGI endocytosed via the clathrin-dependent pathway could be reendocytosed after its recycling to the cell surface or associate with FN via its receptor. Moreover, at acid pH, AMF/PGI could associate directly with FN or HSPG expressed at the cell surface. This

study enabled us to better understand the role of FN in regulation of AMF/PGI/AMF-R endocytosis and to demonstrate that at acid pH, AMF/PGI could be sequestered in the ECM by FN and at the cell surface by HSPG binding.

Lastly, use of epithelial mammary carcinoma PyMT Mgat5 cells showed that Mgat5 and galectin-3 expression is involved in FN matrix remodelling via the activation of FAK, PI3-K and cell motility. We also observed that galectin-3 effects are amplified by coincubation of galectin-3 with the RGD peptide that competes with integrin $\alpha 5 \beta 1$ for binding to FN. The role of galectin-3 in FN matrix remodelling constitutes a new function for this lectin in tumoral cell motility.

This study has therefore opened new avenues to a better understanding of the role of AMF/PGI and galectin-3 interactions with the ECM in the evolution of cancer.

KEY WORDS:

Phosphoglucose isomerase, Galectin-3, GlcNAc-TV; Heparan sulphate, Glycosylation, Cell motility, Endocytosis, Glycolysis, Integrin- $\beta 1$, Mgat5.

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier mon directeur de recherche, le Dr Ivan Robert Nabi qui m'a accueillie dans son laboratoire, qui m'a fait confiance et qui m'a

encadrée et soutenu tout au long de mon doctorat, dans les bonnes et les mauvaises périodes qu'un étudiant peut traverser, de m'avoir aidée à ne pas me décourager. Merci pour ses bons conseils, son esprit critique et sa sagacité scientifique.

Merci aux étudiants de notre laboratoire sans qui rien n'aurait été pareil: Mehrdad toujours souriant, Hui Jun douce et posée, Phuong la working girl des plages du sud qui m'a beaucoup aidé à mon arrivée au laboratoire, Laurence la sportive sympathique, Marilyn la grande calme, ma petite Hélène préférée avec qui j'ai vraiment bien rigolé, Mohammad débrouillard et toujours près à faire des blagues, Jacky le footballeur qui m'a beaucoup aidé dans mon étude sur les mgat5 et qui finit maintenant mes manips, Patrick calme et consciencieux qui a passé toutes mes commandes pendant que Ginette était malade et même après (merci beaucoup Patrick), Zong Jian travaillant et toujours débordé, Hao consciencieux et organisé, la jolie petite Thao, Pascal dynamique et motivé, Nathalie discrète et souriante qui finit aussi mes manips.

Merci à Ginette Guay pour son aide tout au long de mon doctorat et pour son amitié.

Merci au Dr Michel Bouvier, Michel Lauzon et au Dr Vladimir Zhukarev pour m'avoir aidé à utiliser la technique de FRET.

Merci à Jean Léveillé, Marielle Chevrefils, Dr Roger Lippé, Nicole Blouin, Monique Leroux, Gaston Lambert, Lucie Chapdelaine pour leur aide et leur soutien au sein du Département de pathologie et biologie cellulaire.

Merci au Dr Luc Desgroseillers et à son étudiant le Dr Thomas Duchaine du département de Biochimie de l'université de Montréal pour m'avoir montré les techniques de Biologie moléculaire.

Merci à mes parents, Martine et Robert, pour m'avoir encouragée, écoutée, et soutenue pendant toutes mes études, merci pour tout votre amour. Je n'aurais rien pu faire sans vous.

Merci à mon bébé, Fadi, le soleil de ma vie. Merci pour ton amour, ton soutien, ton écoute, merci d'être toujours là, attentif et passionné.

Merci aux membres de ma petite famille. Merci à ma tante Béatrice mon modèle féminin et à Jacques, merci à mon oncle Bernard pour rester toujours jeune, merci à mon cousin Gabriel unique et préféré, sa copine Stéphanie et leur Fille Hélana.

Merci à mes ami(e)s, ma petite FaFa mon amie de toujours militante et aventurière, ma vieille amie Riri la belle voyageuse responsable, Yoann le papa parfait, Marie la physicienne transatlantique qui m'a ouvert les bras du Québec, Nathalie et PO le couple du Nord, Yannick l'organisateur d'aventure, Miguel le cynique amoureux, Stéfan le danseur romantique, Anna la cinématographe overbookée, Mélanie la fille de plein air, Sara le petit grain de folie.

Merci à l'Université de Montréal et au gouvernement du Québec pour m'avoir permis de faire un doctorat et pour m'avoir financée pendant mes études.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	I
SUMMARY	IV
REMERCIEMENTS	V
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES FIGURES	XIII
LISTE DES FIGURES DE L'INTRODUCTION	XIII
LISTE DES FIGURES DES ARTICLES	XV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XVII
AVANT PROPOS	XXI
INTRODUCTION	1
1 LA MATRICE EXTRACELLULAIRE	1
1.1 Les constituants de la matrice extracellulaire	1
1.1.1 Les chaînes de glycosaminoglycans et les protéoglycans. 1	
1.1.1.1 Les glycosaminoglycans	1
1.1.1.2 Les protéoglycans	2
1.1.1.3 La séquestration des protéines par les protéoglycans	8
1.1.2 Les protéines structurales spécialisées	12
1.1.2.1 Le collagène	12
1.1.2.2 La laminine	17
1.1.2.3 La fibronectine	19
1.2 Rôle dans l'adhésion et la motilité cellulaire	22
1.2.1 Les intégrines	22

1.2.2 Les structures d'adhésion	25
1.2.3 La motilité cellulaire.....	28
1.3 L'assemblage de la matrice de fibronectine	31
1.3.1 Le rôle des intégrines et des structures d'adhésion	31
1.3.2 Le rôle du cytosquelette d'actine.....	34
1.3.3 Le rôle des protéoglycans	35
2 L'AMF/PGI ET SON RÉCEPTEUR L'AMF-R.....	39
2.1 L'AMF/PGI.....	39
2.1.1 La structure de l'AMF/PGI	39
2.1.2 L'importance physiologique de l'AMF/PGI	41
2.1.3 La sécrétion de l'AMF/PGI	42
2.2 Le récepteur du facteur autocrine de motilité, l'AMF-R....	42
2.2.1 L'AMF-R est une ubiquitine ligase E3	46
2.3 Le complexe AMF/AMF-R	47
2.3.1 L'importance de l'AMF et de l'AMF-R dans le cancer	52
2.3.1.1 Le rôle de l'AMF/PGI et de l'AMF-R dans la migration cellulaire	53
2.3.1.2 L'AMF/PGI favorise l'angiogenèse et protège les cellules contre l'apoptose	53
3 MGAT5 ET LES GALECTINES.....	56
3.1 La glycosylation des protéines	56
3.1.1 La N-glycosylation	57

3.1.2 Mgat5	59
3.2 Les galectines	61
3.2.1 Les structures et l'assemblage des galectines.....	62
3.2.2 Les fonctions intracellulaires des galectines et leur mode de sécrétion.....	65
3.3 Les fonctions cellulaires de Mgat5 et des galectines	68
3.3.1 L'adhésion cellulaire.....	68
3.3.2 Le système immunitaire et inflammatoire.....	73
3.3.3 Le cancer.....	75
ARTICLES	81
ARTICLE 1.....	82
ARTICLE 2.....	107
ARTICLE 3.....	161
DISCUSSION	194
1. L'AMF/PGI	194
1.1 Les voies non classiques de sécrétion des protéines ...	194
1.1.1 La sécrétion de l'AMF/PGI	194
1.2 Autres protéines secrétées par la voie non classique et associées au cancer.....	197
1.2.1 Le FGF	198
1.2.2 La sécrétion des galectines.....	199

1.3 Les implications pour la sécrétion de l'AMF	200
2 LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DE FIBRONECTINE	202
2.1 L'association de l'AMF avec la matrice de fibronectine .	204
2.1.1 L'endocytose de l'AMF/AMF-R est indispensable à son association avec la matrice de fibronectine	204
2.1.2 L'AMF s'associe spécifiquement à la fibronectine fibrillaire	205
2.1.3 Est-ce que l'association du complexe AMF/AMF-R aux fibrilles de fibronectine dépend de la fibrillogénèse?	206
2.1.4 Quel est le rôle de l'association de l'AMF/AMF-R à la matrice de fibronectine?	207
2.2 L'association de l'AMF avec la fibronectine à pH acide .	209
2.2.1 L'association de l'AMF avec la matrice est directe à pH acide	209
2.2.2 L'étude de la dynamique d'association de l'AMF avec la fibronectine	211
2.2.3 Qu'est-ce qui détermine l'endocytose du complexe AMF/AMF-R plutôt que son association avec la matrice de fibronectine?	212
2.3 L'association de l'AMF en présence d'héparane sulfate	213
2.3.1 La matrice de fibronectine sert de site de stockage de l'AMF	213

2.3.2 L'héparane sulfate favorise l'association de l'AMF à la membrane plasmique des cellules	214
2.3.3 Les molécules de liaison de l'AMF	216
3 LE REMODELAGE DE LA MATRICE DE FIBRONECTINE PAR MGAT5 ET LA GALECTINE-3	218
3.1 Quelles sont les protéines cibles de la galectine-3?	218
3.1.1 Est-ce que la galectine-3 se lie à l'intégrine $\beta 1$?	219
3.1.2 Autres protéines cibles possibles pour la galectine-3	221
3.2 Quel est le rôle du RGD ?	222
3.3 La galectine-3 stimule la motilité cellulaire et le remodelage de la matrice de FN via l'activation de la PI3-K	223
3.4 La fibrillogénèse de la FN versus le remodelage de la matrice de la FN.	226
CONCLUSION	229
PERSPECTIVES	232
PUBLICATIONS	307

LISTE DES FIGURES

LISTE DES FIGURES DE L'INTRODUCTION

Figure 1: <i>Les protéoglycans à héparane sulfate membranaires.</i>	10
Figure 2: <i>Les différentes fonctions des syndécans de surface.</i>	11
Figure 3: <i>Les processus de maturation du procollagène en collagène.</i>	15
Figure 4: <i>Les fibrilles de collagène.</i>	16
Figure 5: <i>Les laminines et la structure des lames basales.</i>	18
Figure 6: <i>Les différents domaines de la fibronectine.</i>	21
Figure 7: <i>La migration cellulaire.</i>	30
Figure 8: <i>Représentation schématique d'un modèle d'assemblage de la matrice de fibronectine (FN).</i>	37
Figure 9: <i>Microscopie électronique du rapprochement des tubules AMF-R avec les mitochondries.</i>	45
Figure 10: <i>Microscopie électronique de l'AMF internalisé dans un corps multivésiculaire.</i>	51
Figure 11: <i>Les deux voies d'internalisation du complexe AMF/AMF-R.</i>	51
Figure 12: <i>La maturation des oligosaccharides liés en N dans le réticulum endoplasmique.</i>	58
Figure 13: <i>Représentation schématique des voies de maturation des N-glycans de type complexe, dans les compartiments médians et transgolgiens.</i>	60
Figure 14: <i>Les différents types de galectine.</i>	64
Figure 15: <i>Représentation schématique du domaine CRD de la galectine-3.</i> ..	64
Figure 16: <i>Représentation schématique du pontage de deux glycoprotéines par la liaison d'un homodimère de galectine-3</i>	67

Figure 17: *Les fonctions matricellulaires de la galectine-8.* 72

Figure 18: *Le rôle de la galectine-3 dans l'adhésion.*..... 72

LISTE DES FIGURES DES ARTICLES

ARTICLE 1

Figure 1. <i>AMF-HA expression of transiently transfected Cos7 cells.</i>	99
Figure 2. <i>Subcellular localization of the AMF-HA fusion protein</i>	101
Figure 3. <i>Glycolysis regulates AMF-HA association with actin-rich protrusions.</i>	103
Figure 4. <i>Quantification of AMF-HA association with actin-rich protrusions.</i> ..	105

ARTICLE 2

Figure 1: <i>PGI/AMF binding to cell surface fibrils requires FN expression.</i>	141
Figure 2: <i>Cell surface PGI/AMF binding is specific for the fibrillar form of FN.</i>	143
Figure 3: <i>FRET analysis shows the direct interaction of PGI/AMF and FN at pH 5 but not at pH 7.5.</i>	145
Figure 4: <i>Heparan sulphate does not affect the cell surface association of PGI/AMF at neutral pH.</i>	147
Figure 5: <i>HS-stimulates the fibronectin-independent binding of PGI/AMF at pH 5.</i>	149
Figure 6: <i>Heparan sulphate induces the FN-independent cell surface association of PGI/AMF at acid pH.</i>	151
Figure 7: <i>PGI/AMF endocytosis is required for its association with cell surface FN fibrils.</i>	153
Figure 8: <i>PGI/AMF and FN do not cointernalize and interact at the cell surface.</i>	155

Figure 9: <i>Endocytosed bPGI/AMF can undergo more than one cycle of endocytosis.</i>	157
---	-----

Figure 10: <i>The complex biology of PGI/AMF and its receptor.</i>	159
--	-----

ARTICLE 3

Figure 1: <i>Mgat5^{-/-} cells exhibit a deficient spreading response to fibronectin, reduced endogenous FN expression and impaired FN fibrillogenesis.</i> ...	182
---	-----

Figure 2: <i>Galectin-3 binding to branching β-1-6 N-glycans regulates FN fibrillogenesis.</i>	184
---	-----

Figure 3: <i>Fibronectin-dependent stimulation of cell motility by galectin-3.</i>	186
--	-----

Figure 4: <i>Disruption of RGD-mediated integrin binding enhances galectin-3 stimulation of FN fibrillogenesis and cell motility.</i>	188
---	-----

Figure 5: <i>FAK and Akt activation regulate galectin-3 mediated fibronectin matrix remodelling and cell migration.</i>	190
---	-----

Supplementary figure: <i>Mgat5 deletion affects β1 integrin localisation into focal contacts.</i>	192
--	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5PA :	5-phospho-D-arabinonate
AMF:	autocrine motility factor ou facteur autocrine de motilité
AMF-R:	autocrine motility factor-receptor
Apaf-1:	apoptotic proteinases activator facteur-1
ARNm:	acide ribonucléique messenger
BAP:	N-bromoacetyethanolamine phosphate
CHO:	cellule ovarienne d'hamster chinois
Cla-hub:	T7-tagged clathrin hub
CRD:	domaine de reconnaissance des carbohydrates
Csk:	carboxy-terminal src kinase
<i>Cue</i>	factor for coupling of ubiquitin conjugation to ER degradation
dynK44A:	forme dominante négative dynamin-1 K44A
dynWT:	wild-type dynamin-1
E1	ubiquitin-activating enzymes
E2	ubiquitin-conjugatin enzymes ou ubcs
E3	ubiquitin protein ligases
ED:	extra domain
EGF:	epidermal growth factor
EGF-R	epidermal growth factor receptor
ERAD:	endoplasmic reticulum associated degradation
ERM:	eitrine, radixine, moesine
FACs:	flow cytometry assays

FAK:	focal adhesion kinase
FGF:	fibroblast growth factor
FITC:	fluorescein isothiocyanate
FN:	fibronectine
FRAP:	fluorescent recovery after photobleaching
FRET:	fluorescence resonance energy transfer
GAG:	glycosaminoglycan
GFP:	green fluorescent protein
GlcNAc-TV:	β 1,6 N-acetylglucosaminyltransferase V
gp78:	glycoprotein of 78 KDa
GPI:	glycosylphosphatidylinositol
GTP:	guanosine triphosphate
HA:	hemagglutinin
HIF-1:	hypoxia inducible factor-1
HS:	héparane sulfate
HSPG:	héparane sulfate protéoglycan
HUVEC:	cellules endothéliales vasculaires humaines ombilicales
IGF:	insulin-like growth factor
IGFBP-3:	insulin-like growth factor binding protein-3
IL:	interleukin
ILK:	integrin-linked kinase
INF- γ :	interferon- γ
JNK:	c-jun N-terminal kinase
L-PHA :	lectine leukoagglutinine

MAPK:	mitogen-activated protein kinase
MEC:	matrice extracellulaire
MEK:	MAP kinase kinase
MF:	maturation factor
MMP:	métalloprotéase
MT-MMP:	matrix-type metalloprotease
MVB :	multivesicular bodie
NANA	acide N-acétylneuraminique
NLK:	neuroleukine
p130cas:	Crk-associated-substrate
PAK:	p21-activated kinase
PDGF:	platelet-derived growth factor
PDGF-R	platelet-derived growth factor-receptor
PGI:	phophoglucose isomérase
PGRL:	protéoglycans riches en leucine
PHI:	phosphohexose isomérase
PI3-K :	phosphatidylinositol 3-kinase
PKC:	protein kinase C
PT:	toxine pertussique
PyMT	polyomavirus middle T antigen
RE:	réticulum endoplasmique
REL:	réticulum endoplasmique lisse
RER:	réticulum endoplasmique rugueux
RGD:	Arg-Gly-Asp
SHP-2:	SH2-containing phosphatase-2

TCR:	T cell receptor
TGF- β :	transforming growth factor- β
tyr-X	tyrosine-X
VEGF:	vascular endothelial growth factor
VEGF-R:	vascular endothelial growth factor receptor
WASP:	wiskott Aldrich syndrome protein

AVANT PROPOS

La métastase est une complication fatale du cancer. La compréhension des mécanismes moléculaires qui y sont associés représente un point important dans la recherche sur le cancer. Le processus métastatique s'effectue en plusieurs étapes: 1) la tumeur primaire grossit et son environnement devient plus hypoxique et plus acide; 2) l'angiogenèse apparaît permettant la croissance de la tumeur; 3) des cellules tumorales se détachent du site primaire de la tumeur pour envahir la matrice extracellulaire; 4) Les cellules tumorales invasives traversent alors la paroi des vaisseaux sanguins par intravasation et sont disséminées dans la circulation sanguine. Une accumulation de cellules vont former une embolie au niveau d'un capillaire qui va leur permettre de traverser à nouveau les vaisseaux par extravasation pour former une nouvelle tumeur dans un site secondaire (Kohn 1993; Price, Bonovich et al. 1997; Kleinman, Koblinski et al. 2001; Welsh and Powis 2003).

La MEC de FN joue un rôle clé dans la progression de la métastase. Elle est impliquée dans la croissance, l'apoptose et la migration des cellules tumorales ainsi que dans l'angiogenèse grâce à sa capacité de séquestrer des facteurs angiogéniques et des facteurs de croissance (Akiyama, Olden et al. 1995; Vlodavsky, Miao et al. 1996; Price, Bonovich et al. 1997). L'organisation de la MEC est modifiée par le contact des cellules tumorales qui l'organisent en réseaux fibrillaires complexes (Zamir and Geiger 2001; Yamada, Pankov et al. 2003) et par l'activité des protéases sécrétées et exprimées à la surface des

cellules tumorales qui la dégradent localement (Sato and Seiki 1996; Liaw and Crawford 1999). La réorganisation et la dégradation de la matrice de FN joue donc un rôle critique dans la migration et l'invasion des cellules tumorales.

Au cours de mon doctorat, je me suis intéressée à l'étude de quatre protéines impliquées dans la métastase: la phosphoglucose isomérase (PGI) qui a été identifiée comme étant le facteur autocrine de motilité (AMF) (Watanabe, Takehana et al. 1996); son récepteur gp78/AMF-R; le gène *Mgat5* codant pour l'enzyme golgienne *β 1-6N-acetylglucosaminyl transferase V* (GlcNAc-TV) responsable de l'ajout des groupements N-acetyllactosamines des protéines; et la lectine galectine-3 qui se lie aux groupements N-acetyllactosamines ajoutés par le produit du gène *Mgat5*.

Le but principal de mon travail fut d'étudier la nature de l'association des ces protéines avec la matrice de FN et si l'expression de ces protéines était impliquée dans sa réorganisation.

Les propriétés tumorigéniques de l'AMF/PGI sont associées à sa surexpression et à sa sécrétion par les cellules tumorales (Liotta, Mandler et al. 1986; Niinaka, Paku et al. 1998). L'AMF stimule la motilité des cellules en se liant à son récepteur l'AMF-R. Le complexe AMF/AMF-R est endocyté par deux voies distinctes: la première voie s'effectue par les cavéoles vers un compartiment du réticulum endoplasmique lisse et la seconde par les vésicules recouvertes de clathrine vers les MVBs qui le recyclent vers les fibrilles de FN à la surface des cellules (Benlimame, Le et al. 1998; Le, Benlimame et al. 2000;

Le, Guay et al. 2002). Les tumeurs constituent souvent un environnement hypoxique et acide (Wike-Hooley, Haveman et al. 1984; Welsh and Powis 2003). Une étude récente a montré que l'AMF pouvait aussi s'associer directement avec les fibrilles de FN à pH acide (Amraei, Jia et al. 2003).

Nous nous sommes intéressés à la voie d'endocytose dépendante des vésicules recouvertes de clathrine afin de mieux comprendre la nature de l'association de l'AMF avec la matrice de FN. Nous avons fabriqué une protéine de fusion de l'AMF/PGI à laquelle nous avons ajouté une étiquette HA, l'AMF/PGI-HA, que nous avons surexprimé dans les cellules épithéliales tumorales de singe Cos. Nous avons étudié l'expression et la sécrétion de cette protéine à l'aide des techniques de la microscopie à fluorescence et du SDS-PAGE. Nous avons déterminé que la surexpression de l'AMF/PGI-HA était liée à sa sécrétion et qu'elle était surtout exprimé au niveau des régions riches en actine des cellules Cos et que cette localisation dépendait de l'activité glycolytique de la cellule. Toutefois, l'AMF/PGI-HA sécrétée dans le milieu extracellulaire n'était ni endocytée ni recyclée par les cellules Cos et elle ne s'associait pas à la matrice de FN à la surface des cellules. Ce modèle ne nous permettait donc pas de répondre à notre objectif de départ.

Nous avons donc changé d'outils et de modèle cellulaire et nous avons étudié la spécificité et la nature de l'association de l'AMF/PGI avec la matrice de FN, à pH neutre et à pH acide.

Les cellules fibroblastiques FN^{+/+} (qui expriment la FN) et les cellules FN^{-/-} (qui n'expriment pas la FN) nous ont permis de déterminer l'importance de l'expression de la FN pour l'association de l'AMF/PGI à la surface des cellules. Nous avonsensemencé les cellules NIH-3T3 sur un substrat de FN afin de

confirmer la spécificité de l'association de l'AMF avec la FN organisée en fibrille plutôt qu'avec la FN soluble. Nos résultats ont montré que l'AMF/PGI s'associe spécifiquement avec la FN fibrillaire mais qu'elle n'est pas impliquée dans la fibrillogenèse de la matrice de FN. Nous avons utilisé la technique de FRET afin de mieux comprendre la nature de l'association de l'AMF/PGI avec la matrice de FN en fonction du pH, à savoir si cette association était directe ou indirecte. L'expression des formes dominantes négatives de la dynamine-1, la dynK44A et de la clathrine, la cla-hub, nous a permis d'inhiber les deux voies d'endocytose du complexe AMF/PGI/AMF-R et de confirmer l'importance de l'endocytose de l'AMF pour son association avec la matrice de FN à pH neutre.

Enfin, dans la dernière partie du projet, nous avons étudié le rôle de l'expression du produit du gène *Mgat5* (GlcNAc-TV) et de la galectine-3 dans la fibrillogenèse de la FN.

L'expression de *Mgat5* et des galectines est liée à la progression tumorale (Dennis, Granovsky et al. 1999; Van Den Brule, Califice et al. 2002; Bidon-Wagner and Le Pennec 2004; Takenaka, Fukumori et al. 2004). Nous avons utilisé des cellules épithéliales mammaires PyMT *Mgat5*^{-/-}, obtenues à partir de souris exprimant l'oncogène viral *Polyomavirus middle T antigen* (PyMT) et déficientes pour le gène *Mgat5* (*Mgat5*^{-/-}) (Granovsky, Fata et al. 2000). La perte de l'expression de *Mgat5* dans les cellules PyMT *Mgat5*^{-/-} est associée à la perte des capacités invasives et tumorigéniques des cellules (Granovsky, Fata et al. 2000). Nous avons déterminé que l'expression de *Mgat5* était liée à l'étalement des cellules, à la migration et à la fibrillogenèse de la FN. L'utilisation d'un inhibiteur de la voie de maturation des N-glycans, l' α -

mannosidase II, et du β -lactose, un compétiteur de la liaison des galectines au niveau des branchements β 1-6 N-glycan nous ont permis de vérifier le lien entre l'expression de Mgat5 et de la galectine-3 avec la fibrillogenèse de la FN. Nous avons déterminé, avec la protéine recombinante de la galectine-3, que la liaison de la galectine-3 au niveau du produit du gène Mgat5 était impliquée dans la motilité et dans le remaniement de la matrice de FN. Nous avons déterminé par l'immunoprécipitation et en utilisant la L-PHA (une lectine qui reconnaît les branchements β 1-6 N-glycan) que l'intégrine β 1 pouvait être la protéine cible de la galectine-3. Enfin, l'utilisation d'un inhibiteur de la PI3-K, le LY294002, et d'anticorps spécifiques dirigés contre les protéines FAK et Akt/PKB nous ont permis de déterminer que la PI3-K et la FAK pourrait possiblement être impliquées dans la voie de stimulation de la motilité et du remaniement de la matrice de FN par la galectine-3.

Ces études de l'AMF/PGI et de la galectine-3 ont permis de mieux comprendre le rôle de la matrice de FN dans la métastase.

BIBLIOGRAPHIE

- Akiyama, S. K., K. Olden, et al. (1995). "Fibronectin and integrins in invasion and metastasis." Cancer Metastasis Rev **14**(3): 173-89.
- Amraei, M., Z. Jia, et al. (2003). "Acid-induced conformational changes in phosphoglucose isomerase result in its increased cell surface association and deposition on fibronectin fibrils." J Biol Chem **278**(40): 38935-41.
- Benlimame, N., P. U. Le, et al. (1998). "Localization of autocrine motility factor receptor to caveolae and clathrin-independent internalization of its ligand to smooth endoplasmic reticulum." Mol Biol Cell **9**(7): 1773-86.
- Bidon-Wagner, N. and J. P. Le Pennec (2004). "Human galectin-8 isoforms and cancer." Glycoconj J **19**(7-9): 557-63.
- Dennis, J. W., M. Granovsky, et al. (1999). "Glycoprotein glycosylation and cancer progression." Biochim Biophys Acta **1473**(1): 21-34.
- Granovsky, M., J. Fata, et al. (2000). "Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice." Nat Med **6**(3): 306-12.
- Kleinman, H. K., J. Koblinski, et al. (2001). "Role of basement membrane in tumor growth and metastasis." Surg Oncol Clin N Am **10**(2): 329-38, ix.
- Kohn, E. C. (1993). "Development and prevention of metastasis." Anticancer Res **13**(6B): 2553-9.
- Le, P. U., N. Benlimame, et al. (2000). "Clathrin-mediated endocytosis and recycling of autocrine motility factor receptor to fibronectin fibrils is a limiting factor for NIH-3T3 cell motility." J Cell Sci **113** (Pt 18): 3227-40.

- Le, P. U., G. Guay, et al. (2002). "Caveolin-1 Is a Negative Regulator of Caveolae-mediated Endocytosis to the Endoplasmic Reticulum." J Biol Chem **277**(5): 3371-3379.
- Liaw, L. and H. C. Crawford (1999). "Functions of the extracellular matrix and matrix degrading proteases during tumor progression." Braz J Med Biol Res **32**(7): 805-12.
- Liotta, L. A., R. Mandler, et al. (1986). "Tumor cell autocrine motility factor." Proceedings of the National Academy of Science **83**: 3302-3306.
- Niinaka, Y., S. Paku, et al. (1998). "Expression and secretion of neuroleukin/phosphohexose isomerase/maturation factor as autocrine motility factor by tumor cells." Cancer Research **58**: 2667-2674.
- Price, J. T., M. T. Bonovich, et al. (1997). "The biochemistry of cancer dissemination." Crit Rev Biochem Mol Biol **32**(3): 175-253.
- Sato, H. and M. Seiki (1996). "Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in tumor metastasis." J Biochem (Tokyo) **119**(2): 209-15.
- Takenaka, Y., T. Fukumori, et al. (2004). "Galectin-3 and metastasis." Glycoconj J **19**(7-9): 543-9.
- Van Den Brule, F., S. Califice, et al. (2002). "Expression of galectins in cancer: A critical review." Glycoconj J **19**(7-9): 537-42.
- Vlodavsky, I., H. Q. Miao, et al. (1996). "Involvement of heparan sulfate and related molecules in sequestration and growth promoting activity of fibroblast growth factor." Cancer Metastasis Rev **15**(2): 177-86.
- Watanabe, H., K. Takehana, et al. (1996). "Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide." Cancer Res **56**(13): 2960-3.

Welsh, S. J. and G. Powis (2003). "Hypoxia inducible factor as a cancer drug target." Curr Cancer Drug Targets **3**(6): 391-405.

Wike-Hooley, J. L., J. Haveman, et al. (1984). "The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease." Radiother Oncol **2**(4): 343-66.

Yamada, K. M., R. Pankov, et al. (2003). "Dimensions and dynamics in integrin function." Braz J Med Biol Res **36**(8): 959-66.

Zamir, E. and B. Geiger (2001). "Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions." J Cell Sci **114**(Pt 20): 3583-90.

INTRODUCTION

1 LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

La MEC joue un rôle clé dans l'architecture et l'homéostasie des tissus. Elle est composée de protéines et de polysaccharides variés qui sont sécrétés localement par les cellules et assemblés dans un réseau organisé. La MEC joue un rôle fondamental dans le contrôle du comportement cellulaire, tant au cours du développement embryonnaire que dans le maintien de l'intégrité des phénotypes cellulaires différenciés. De cette façon, elle constitue la première barrière contre l'invasion cellulaire lors de la croissance des tumeurs, la métastase et l'angiogenèse. Elle est composée de protéines structurales spécialisées (comme le collagène, l'élastine, la laminine et la FN), de protéoglycans (comme le perlecan), de glycosaminoglycans (GAGs), de sels et d'eau (Bosman and Stamenkovic 2003). Les protéines de la MEC interagissent avec les cellules via des récepteurs spécifiques comme les intégrines (Geiger, Bershadsky et al. 2001). Les interactions entre les cellules et la MEC sont très importantes pour la régulation du comportement cellulaire. Elles maintiennent et régulent l'adhésion et la motilité cellulaire, initient l'assemblage de la MEC à la surface des cellules, agissent comme site de transmission des forces mécaniques entre la cellule et la MEC et régulent la prolifération cellulaire et l'expression des gènes (Schwartz, Schaller et al. 1995).

1.1 Les constituants de la matrice extracellulaire

1.1.1 Les chaînes de glycosaminoglycans et les protéoglycans

1.1.1.1 Les glycosaminoglycans

Les GAGs sont des longues chaînes de polysaccharides non ramifiées qui sont généralement composées des séquences répétées de disaccharide hexuronique et de D-glucosamine modifiées à différentes positions par sulfatation, épimérisation et N-acétylation (Kramer and Yost 2003). Les GAGs sont classifiés en 4 groupes en fonction de la composition de leurs résidus glucidiques, du type de liaison entre ces résidus, du nombre et de la position des groupements sulfates: l'acide hyaluronique (AH), le chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, l'héparane sulfate (HS) et l'héparine et enfin le kératane sulfate (Kramer and Yost 2003). À l'exception de l'acide hyaluronique (AH), les GAGs se lient de façon covalente à un noyau protéique pour former les protéoglycans.

1.1.1.2 Les protéoglycans

Les protéoglycans sont exprimés dans la plupart des tissus où ils représentent les constituants majeurs de la surface des cellules et de la MEC (Bernfield, Gotte et al. 1999). Les protéoglycans sont impliqués dans beaucoup de processus reliés à l'interaction cellule-cellule et cellule-MEC comme l'adhésion, la migration, la prolifération, la différenciation et l'endocytose des lipoprotéines. Ils procurent également des propriétés biomécaniques à certains tissus comme le cartilage. Ceux-ci les amènent à intervenir autant dans des mécanismes cellulaires normaux que dans les mécanismes pathologiques comme la morphogenèse, la réparation des tissus, l'inflammation, l'angiogenèse et la métastase du cancer (Vlodavsky, Goldshmidt et al. 2001).

Il existe différentes familles de protéoglycans, la plus répandue est la famille des hyalectines qui regroupe les protéoglycans qui lient l'AH. Cette famille comprend l'aggrécane, le versican, le neurocan, le brevican et le CD44 qui est un récepteur à

l'AH exprimé à la surface des cellules (Wight 2002). Chaque membre de cette famille s'exprime dans un tissu particulier. L'aggrécan s'exprime surtout dans le cartilage, le neurocan et le brevican sont retrouvés dans le système nerveux central et le versican se présente dans un grand nombre de tissus dont le tissu cardiaque. Ces protéoglycans sont caractérisés par différents motifs structuraux dont un domaine identique à EGF, un domaine C-terminal de reconnaissance des carbohydrates (CRD), un domaine de liaison à l'AH et un domaine central de 593 acide aminés contenant des sites d'attachement pour 3 chaînes de chondroïtine sulfate (Perkins, Nealis et al. 1989).

L'aggrécan est le principal protéoglycan exprimé dans le cartilage articulaire par les chondrocytes (Kiani, Chen et al. 2002). Il est principalement constitué de chaînes de chondroïtine sulfate mais il peut également contenir du kératane sulfate et des oligosaccharides liés en N et en O. Après sa sécrétion, l'aggrécan s'auto-assemble en une structure multimoléculaire de plus de 50 monomères liés de façon non covalente à l'AH. Les GAGs sont fortement chargés négativement à cause de la présence de groupements sulfates. Cette négativité permet d'attirer des nuages de cations, tel le Na^+ , qui par leurs propriétés osmotiques vont retenir de grandes quantités d'eau dans la matrice. Cette eau crée une pression de turgescence qui permet à la matrice de résister aux forces de compression. L'aggrécan et l'eau qu'il retient sont responsables des propriétés biomécaniques du cartilage. De plus, l'aggrécan se lie au collagène ce qui confère au cartilage une résistance à la déformation (Mow, Zhu et al. 1989). L'aggrécan est impliqué dans les interactions chondrocyte-chondrocyte et chondrocyte-MEC par sa capacité à lier l'AH exprimé à la surface des cellules et au niveau de la MEC.

Le versican est une grosse molécule de protéoglycan exprimée par les fibroblastes dans différents tissus dont dans la paroi des vaisseaux. Comme son nom l'indique, le versican est une molécule hautement interactive et versatile. Sa chaîne de chondroïtine sulfate diffère en taille et en composition dépendamment de l'origine du tissu et des conditions de culture et contient différents ratios de chondroïtine-6-sulfate versus chondroïtine-4-sulfate. Le versican joue un rôle important dans l'adhésion et la migration des cellules et il possède des propriétés anti-apoptotiques (Wu, Chen et al. 2002). Il régule la migration des cellules neuronales (Perissinotto, Iacopetti et al. 2000) et il joue un rôle important dans la migration des cellules embryonnaires cardiaques (Camenisch, Spicer et al. 2000). Il est également impliqué dans la prolifération cellulaire via son domaine homologue à l'EGF qui lui confère une propriété de mitogène (Zhang, Cao et al. 1998). Les facteurs de croissance PDGF et TGF- β augmentent son expression ainsi que la longueur de ses chaînes de chondroïtine sulfate entraînant une expansion de la MEC (Schonherr, Jarvelainen et al. 1991; Schonherr, Kinsella et al. 1997) qui, par des contraintes mécaniques, va contrôler la forme et la division des cellules du muscle lisse des artères (Evanko, Angello et al. 1999). Le versican interagit avec de nombreuses protéines de la MEC et joue un rôle important dans son assemblage. Sa structure lui permet de nombreux types d'interactions protéine-protéine et protéine-carbohydate. Le versican interagit avec l'AH, la tenascine-R et les fibulines-1 et 2 (une famille de protéines de la MEC impliquées dans le développement du muscle cardiaque) (Wight 2002). Le versican est également impliqué dans les étapes précoces de la formation de la MEC du cartilage mais son expression est arrêtée après le dépôt de l'aggrécan (Knudson and Knudson 2001).

Le neurocan et le phosphacan sont deux protéoglycans de 136 kDa et de 173 kDa respectivement, généralement exprimés dans les tissus nerveux. Le neurocan est exprimé par les neurones et le phosphacan par les cellules astrogliales (Rauch, Karthikeyan et al. 1992; Engel, Maurel et al. 1996). Ces deux protéoglycans sont impliqués dans la croissance des neurones et dans le développement embryonnaire (Friedlander, Milev et al. 1994; Milev, Friedlander et al. 1994; Maeda and Noda 1996). Ils sont également exprimés hors du système nerveux par les cellules transformées et dans certains tissus embryonnaires (Balsamo, Ernst et al. 1995; Harigaya, Ogawa et al. 1996). Le phosphacan contient trois chaînes de chondroïtine sulfate mais il peut également exprimer des chaînes de kératane sulfate (Maurel, Rauch et al. 1994).

Il existe également une autre famille de protéoglycans: la famille des petits protéoglycans riches en leucine (PGRL) qui peut-être divisée en 3 classes distinctes.

La classe I comprend la décorine et le biglycan. Ces deux protéoglycans lient le TGF- β et sont exprimés dans différentes régions du cartilage articulaire adulte. La décorine est exprimée dans la matrice inter-territoriale alors que la biglycan est surtout exprimé dans la matrice péri-cellulaire. La décorine porte une chaîne à chondroïtine ou à dermatane sulfate et sa conformation lui permet d'être impliquée avec le collagène de type IX dans la formation des fibrilles de collagène de type I. La décorine est le membre de la famille des PGRLs le plus exprimé dans le cartilage et son expression dans le cartilage articulaire augmente avec l'âge (Melching and Roughley 1989). Le biglycan possède un corps protéique de 43kDa et porte lui aussi des chaînes de chondroïtine sulfate ou de dermatane sulfate et des sucres liés en N.

Il est exprimé par les astrocytes et il favorise la survie des neurones néocorticaux (Koops, Kappler et al. 1996).

La classe II comprend la fibromoduline et le lumican. La fibromoduline, qui porte 4 chaînes de kératane sulfate, se lie aux fibres de collagène et régule leurs diamètres. Le lumican est le principal protéoglycan à kératane sulfate à être exprimé dans la cornée mais il est également exprimé dans les tissus connectifs comme le cartilage et son expression comme celle de la fibromoduline augmente dans le cartilage avec l'âge (Melching and Roughley 1989; Plaas, Neame et al. 1990).

La classe III comprend l'épiphycan, un protéoglycan à dermatane sulfate. L'épiphycan est un petit protéoglycan qui est exprimé au moment de la maturation du cartilage (Knudson and Knudson 2001).

Les protéoglycans à héparane sulfate (HSPG) comprennent différentes molécules dont le perlecan, le glypican et la famille des syndécans.

Le perlecan est le principal HSPG à être exprimé dans les membranes basales, toutefois, il est également exprimé dans la matrice péri-cellulaire du cartilage bien qu'il s'agit d'un tissu organisé sans membrane basale (SundarRaj, Fite et al. 1995). Le perlecan contient 5 modules protéiques majeurs (Iozzo, Cohen et al. 1994). Un domaine N-terminal qui contient un site d'attachement aux GAGs, un domaine II homologue au récepteur du LDL, un domaine III homologue à la laminine, un domaine IV constitué de 21 séquences répétées de l'immunoglobuline et un domaine V, C-terminal, comportant un motif identique à l'EGF et deux domaines possibles de liaison pour la laminine. Il porte des chondroïtines sulfates ou des héparanes sulfates (SundarRaj, Fite et al. 1995). Le perlecan peut s'auto-agréger et

interagir avec la laminine, le nidogène et la FN. Les intégrines serviraient de récepteur pour le perlecan.

Certains protéoglycans sont exprimés à la surface des cellules. Ils possèdent des noyaux protéiques transmembranaires comme les syndécans, ou sont associés à la membrane plasmique par la molécule d'ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI) comme les glypicans (Bernfield, Gotte et al. 1999) (Figure 1). Les syndécans sont des protéoglycans dont le domaine extracellulaire porte des chaînes de GAG à chondroïtine sulfate et à HS et le domaine intracellulaire interagit avec le cytosquelette d'actine du cortex intracellulaire (Yoneda and Couchman 2003). Les syndécans sont exprimés à la surface de différents types cellulaires dont les fibroblastes et les cellules épithéliales où ils servent de co-récepteurs avec les intégrines à certaines molécules de la MEC comme le collagène et la FN. Les syndécans peuvent ainsi se lier à certains facteurs de croissance, via leurs chaînes de GAG, et les présenter à leurs récepteurs sur la même cellule (Bernfield, Gotte et al. 1999).

Dans la MEC, les protéoglycans se lient aux protéines qui la composent tels que la FN, la laminine et le collagène interstitiel mais aussi à de nombreuses molécules bio-actives comme les facteurs de croissance, les chémokines, les lipoprotéines et les enzymes (Yamaguchi, Mann et al. 1990; Gitay-Goren, Soker et al. 1992; Sasisekharan, Ernst et al. 1997; Esparza-Lopez, Montiel et al. 2001). Les charges négatives des protéoglycans permettent la liaison aux régions basiques des facteurs de croissance. L'utilisation de mutants pour l'HS a démontré que son expression était indispensable à la signalisation intercellulaire au cours du développement embryonnaire (Lin, Wei et al. 2000; Morio, Honda et al. 2003). La

liaison du FGF-2, du TGF- β , et de VEGF à leurs récepteurs membranaires est favorisée par les protéoglycans (Gitay-Goren, Soker et al. 1992; Esparza-Lopez, Montiel et al. 2001). Le TGF- β est un facteur de croissance qui se lie au bétaglycan à la surface des cellules et aux décorines au niveau de la MEC. Sa liaison aux décorines inhibe son activité (Yamaguchi, Mann et al. 1990).

1.1.1.3 La séquestration des protéines par les protéoglycans

Les protéoglycans peuvent agir comme activateur ou inhibiteur de l'activité des facteurs de croissance: quand ils sont exprimés à la surface des cellules, ils peuvent retenir les facteurs de croissance près des récepteurs membranaires ou agir comme co-récepteur pour les facteurs de croissance (Figure 2) (Nugent and Iozzo 2000; Turnbull, Powell et al. 2001). A l'inverse, les protéoglycans de la MEC peuvent agir comme site de stockage pour les facteurs de croissance, les enzymes et de protéines plasmatiques en les séquestrant loin de leur site d'action ou sous une forme inactive (Ruoslahti, Yamaguchi et al. 1992; Vlodavsky, Miao et al. 1996). Certains facteurs de croissances sont stockés sous forme inactive et deviennent actifs au moment de leur libération lors de la dégradation des protéines de la MEC par des protéases spécialisées (Vlodavsky, Bar-Shavit et al. 1991).

De nombreuses hypothèses ont été proposées pour expliquer le rôle de la séquestration des protéines par les protéoglycans. La séquestration des protéines par les protéoglycans pourrait permettre de protéger la protéine d'une dégradation protéolytique, prolongeant ainsi son action. Cette séquestration pourrait également permettre d'inhiber de façon stérique l'activité de la protéine, de concentrer la protéine en attente d'être libérée et de restreindre ainsi son champ d'action au

moment de sa libération (Figure 2) (Ruoslahti, Yamaguchi et al. 1992; Vlodavsky, Miao et al. 1996). L'angiogenèse, qui est associée entre autre à la progression des tumeurs et à la réparation des tissus, est un processus au cours duquel des cellules endothéliales vont se diviser et migrer depuis un vaisseau préexistant vers un nouveau capillaire. Elle requiert la protéolyse des protéines de la MEC, la migration et la prolifération des cellules endothéliales, et la synthèse des nouveaux composés de la matrice (Hanahan and Folkman 1996).

L'héparanase est une endo- β -D-glucuronidase qui dégrade les HS au cours de l'angiogenèse (Elkin, Ilan et al. 2001). Cette enzyme clive les ponts glycosidiques par un mécanisme d'hydrolase. Le FGF-2 et le VEGF sont tous deux des facteurs angiogéniques qui sont séquestrés dans la MEC par les HSPGs (Vlodavsky, Miao et al. 1996). Le FGF-2 est séquestré sous forme inactive par les HSPGs et cette liaison le protège de l'inactivation par oxydation et par la chaleur (Vlodavsky, Miao et al. 1996). La liaison de VEGF aux HSPGs rétablit l'activité de VEGF après un dommage oxydatif (Gengrinovitch, Berman et al. 1999). Cette séquestration permet de limiter l'action angiogénique de ces facteurs sur les cellules endothéliales vasculaires à une zone localisée au niveau de la MEC dégradée et donc de limiter la néo-vascularisation des vaisseaux aux processus de réparation des tissus inflammatoires et au développement des tumeurs (Vlodavsky, Miao et al. 1996).

Les HSPGs servent également de réservoir pour beaucoup d'autres facteurs comme IL-7, $\text{INF}\gamma$, IL-3 et GM-CSF au niveau de la moelle osseuse (Roberts, Gallagher et al. 1988). Ces cytokines, une fois liées, pourront être présentées sous une forme biologiquement active par les cellules hématopoïétiques.

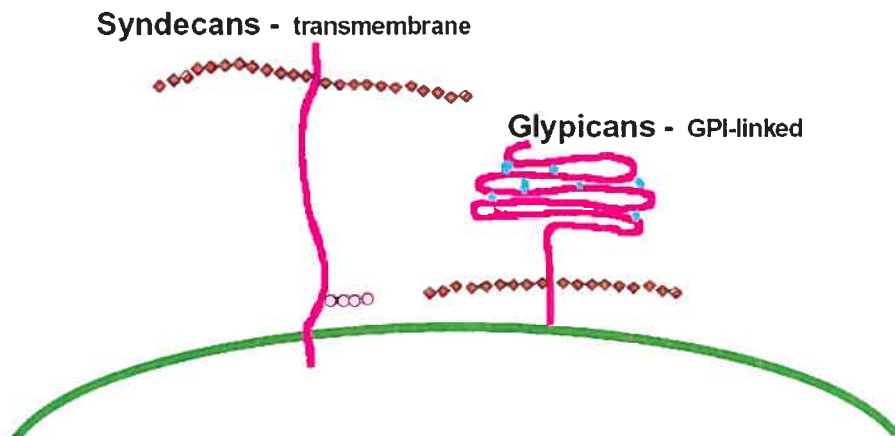


Figure 1: Les protéoglycans à héparane sulfate (HSPG) membranaires. Les syndécans sont des protéines transmembranaires qui portent des chaînes HS de façon distale par rapport à la membrane plasmique. Les glypicans sont liés de façon covalente à la membrane par un lien phosphatidylinositol au feuillet externe de la membrane plasmique. Dessin tiré de l'article de revue (Bernfield, Gotte et al. 1999).

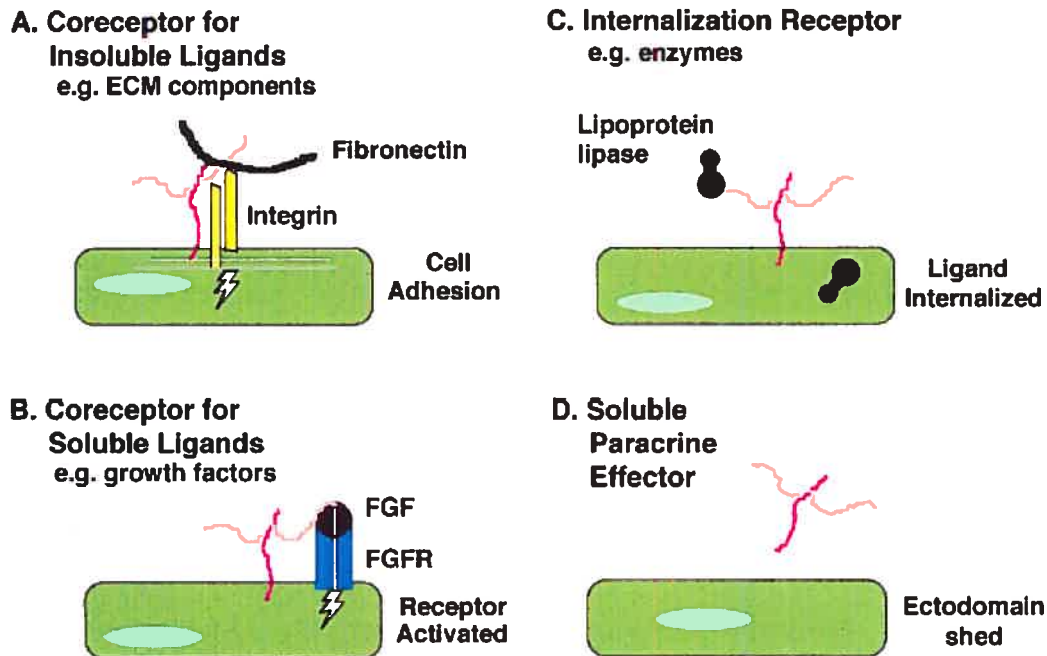


Figure 2: Les différentes fonctions des syndécans de surface. Différentes fonctions ont été proposées: (A) Co-récepteur des ligands insolubles comme les molécules de la MEC, les cellules, les microbes; (B) Co-récepteurs pour des ligands solubles comme les facteurs de croissance, les chémokines, et les cytokines; (C) Internalisation des récepteurs des ligands solubles comme les enzymes via la voie des vésicules de clathrine ou des cavéoles vers une voie dégradative, de recyclage ou de transcytose; (D) Effecteurs solubles paracrines en libérant le domaine extracellulaire de l'héparane sulfate protéoglycan de la membrane plasmique. Dessin tiré de l'article de revue (Bernfield, Gotte et al. 1999).

1.1.2 Les protéines structurales spécialisées

1.1.2.1 Le collagène

Le collagène est une protéine fibreuse qui possède une structure hélicoïdale rigide à trois brins. Trois chaînes polypeptidiques de collagène, appelées chaînes α , sont enroulées en hélice les unes autour des autres. Le collagène contient le motif répété Gly-X-Y (ou X et Y représente le plus souvent la proline et l'hydroxyproline respectivement). Il existe plus de 25 chaînes α de collagène codées par des gènes distincts mais seulement 20 types de molécules de collagène ont été identifiées (Kadler 2004).

Le collagène est constitué de 3 chaînes enroulées en hélice. Au cours de sa biosynthèse, les précurseurs des chaînes α sont synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER) sous forme de polypeptides ayant à leurs extrémités amino et carboxyterminale une courte queue non hélicoïdale de 15 à 25 acides aminés, nommée pro-peptide, qui empêche l'assemblage de fibrilles de collagène à l'intérieur de la cellule. Ces pro-peptides seront dégradés par des enzymes protéolytiques après la sécrétion de la molécule de pro-collagène dans l'espace extracellulaire. La perte de ces extrémités transforme les molécules de pro-collagène en molécules de collagène capables de s'auto-assembler spontanément en suivant les lois de l'entropie (Williams, Gelman et al. 1978). La lysyl oxydase (protein-6-oxidase) est une amine oxydase qui catalyse la déamination oxydative des résidus lysines et hydroxylysines en peptidyl- α -aminoadipic-d-semialdehydes [Kagan, 2003 #723]. Ces résidus aldéhydes vont former spontanément des liens

covalents inter- et intra-chaîne qui vont stabiliser et insolubiliser les fibres de collagènes. La lysyl oxydase est une enzyme clé dans le control de la maturation du collagène impliquée dans la formation et la réparation de la MEC.

La glucosylation non-enzymatique du collagène mène à la formation de liens glucose intermoléculaires nommés *advanced glycation end products* (AGE) [Sajithlal, 1998 #726]. L'AGE est formé par la liaison entre un sucre réactif et le groupe aminé du résidu lysine de la molécule de collagène. L'AGE va induire la formation de liens covalents entre les molécules de collagène qui vont diminuer la flexibilité et le renouvellement de la matrice de collagène et augmenter sa rigidité [Paul, 1996 #727]. L'AGE s'accumule lentement sur le collagène et l'élastine et modifie leurs structures et leurs fonctions. De plus l'AGE est souvent associé avec une augmentation du collagène total [Burgess, 2001 #725]. C'est pourquoi l'AGE est associé à certaines pathologies liées au vieillissement comme le diabète et l'arthrite [Saudek, 2003 #730; Paul, 1996 #727]. En augmentant la rigidité de la matrice de collagène, les AGEs vont affecter la structure et la fonction de certains tissus comme le cartilage et le myocarde [Zieman, 2004 #729; Saudek, 2003 #730].

Les molécules de collagène vont s'associer en polymères ordonnés ou fibrilles de collagène qui sont des structures de 30 à 300 nm de diamètre avec une longueur de plus d'une centaine de micromètre (Figure 3). En microscopie électronique, les fibrilles collagène présentent des striations transversales plus sombre tous les 67 nm à cause de l'alternance des molécules de collagène dans la fibrille (Williams, Gelman et al. 1978; Kadler 2004) (Figure 4). Elles peuvent également s'agréger en faisceaux de plusieurs micromètres de diamètre, en forme de câble.

La famille la plus importante de collagène est celle des molécules de collagène qui s'assemblent en fibrilles. Elle comprend les collagènes de type I, II, III, V, et XI. Les collagènes de types IX et XII sont des collagènes qui restent sous forme de monomère et s'associent aux fibrilles de collagène et lient ces fibrilles entre elles et avec les autres molécules de la MEC. Le collagène de type IV s'assemble en feuillet feutré qui constitue la majeure partie de la lame basale mature alors que le type VII s'assemble en dimères qui participent à l'attachement de la lame basale des épithéliums aux couches sous-jacentes du tissu conjonctif. Les molécules de collagène de type IV sont plus flexibles que les collagènes fibrillaires, leurs hélices tricaténaires sont flexibles et elles conservent leurs régions terminales qui empêchent la formation de fibres. Elles s'assemblent en un réseau lié par des ponts disulfures et d'autres liens covalents. Les cellules contrôlent la disposition des fibrilles de collagène après leur sécrétion. Les fibroblastes remodelent les fibrilles de collagène par compression en feuillet et en les étirant sous forme de câble (Williams, Gelman et al. 1978; Kuznetsova, Chi et al. 1998).

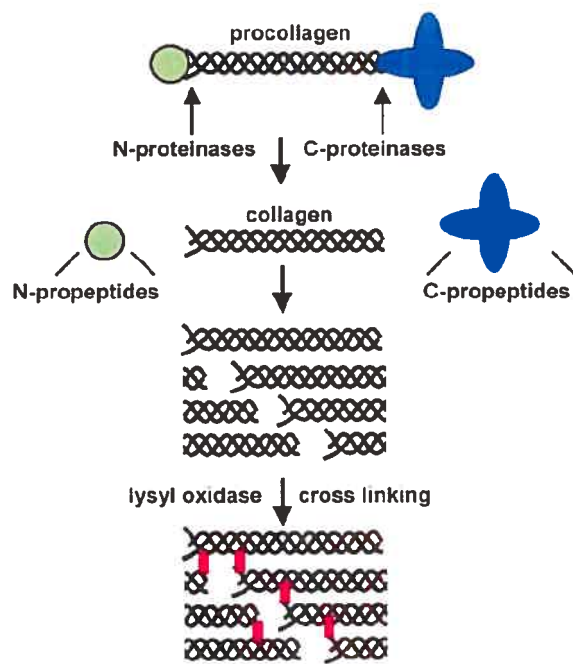


Figure 3: Les processus de maturation du pro-collagène en collagène. Les molécules de collagène sont représentées par une triple hélice. Les liens covalents transversaux, effectués par les lysyls oxydases, entre les triples hélices, sont représentés en rouge. Dessin tiré de l'article de revue (Kadler 2004).

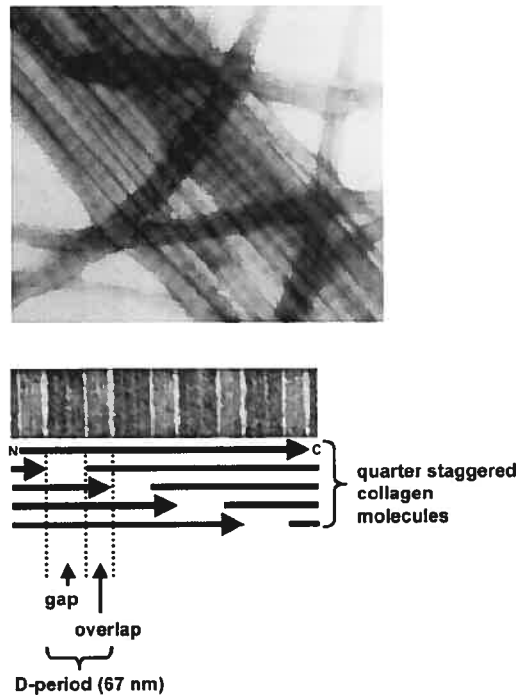


Figure 4: Les fibrilles de collagène. Des fibrilles de collagène ont été reconstituées *in vitro* à partir de collagène de type I de poulet et observées en microscopie électronique par un marquage négatif. Chaque fibrille, représentée schématiquement par une flèche, présente une périodicité axiale de 67 nm qui est visible grâce à l'accumulation d'un marquage dense aux électrons dans les zones d'espace (gap) entre les fibrilles. Dessin tiré de l'article de revue (Kadler 2004).

1.1.2.2 La laminine

Principalement localisées dans les membranes basales, les laminines sont des grandes glycoprotéines constituées de trois chaînes polypeptidiques génétiquement distinctes, α , β et γ , assemblées par des ponts disulfures dans une structure en forme de croix. Jusqu'à présent, 5 chaînes α , 3 β et 3 chaînes γ ont été identifiées, elles s'assemblent en 15 isoformes différents. Par exemple, la laminine 1 est composée des chaînes $\alpha1\beta1\gamma1$ et la laminine-2 de $\alpha2\beta1\gamma1$ etc (Figure 5). L'expression et l'assemblage des différentes sous-unités varient de façon spatio-temporelle laissant présumer des rôles biologiques et structuraux spécifiques pour chaque isoforme (Cognato and Yurchenco 2000). Les laminines sont des molécules biologiquement très actives, elles sont impliquées dans la croissance des neurites, la métastase des tumeurs, l'adhésion et la migration des cellules et dans l'angiogenèse (Kleinman, Koblinski et al. 2001).

Les molécules de laminine s'auto-assemblent avec les molécules de collagène de type IV pour former les membranes basales de la majorité des tissus (Cognato and Yurchenco 2000). Les mécanismes d'assemblage des lames basales ne sont pas encore totalement compris. Ils semblent nécessiter l'expression de différents récepteurs membranaires comme les intégrines, les α/β -dystroglycans, et les syndécans (Edwards, Hatton et al. 1998; Brakebusch, Grose et al. 2000; Klass, Couchman et al. 2000). Toutefois, l'expression de ces récepteurs semble être surtout impliquée dans des mécanismes visant à rassembler et à concentrer les molécules de laminine dans un périmètre donné pour favoriser l'autoassemblage de la matrice plutôt que le dans processus d'assemblage lui-même.

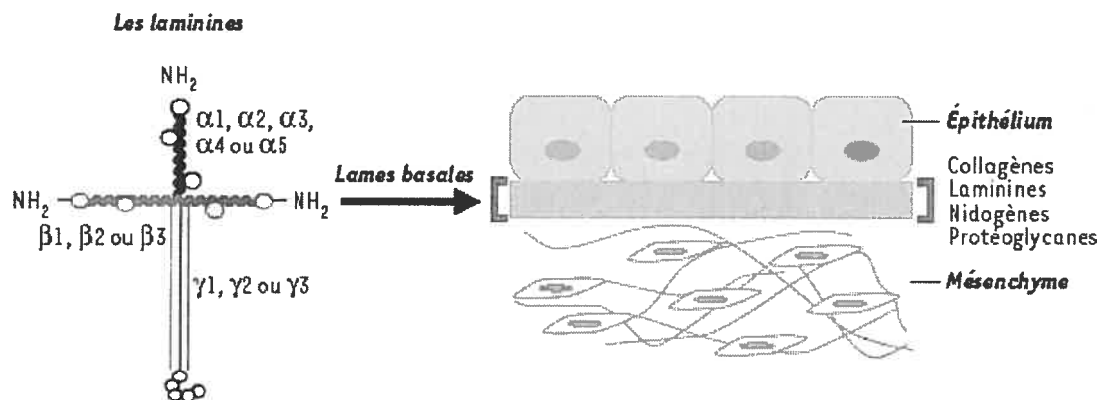


Figure 5: Les laminines et la structure des lames basales. Les laminines comportent trois chaînes génétiquement distinctes, α , β et γ , reliées par des ponts disulfures. Les lames basales sont des fins feuillets de MEC au contact des cellules ou localisés à l'interface entre un épithélium et un tissu conjonctif qui sont constitués de laminine mais contient aussi des collagènes IV, des nidogènes et des protéoglycans. Figure issue de l'article suivant (Rouselle 2002).

1.1.2.3 La fibronectine

La FN est une protéine majeure de la MEC. Son expression est indispensable au développement des vertébrés car sa perte est létale dès le stade embryonnaire (George, Georges-Labouesse et al. 1993). Elle est impliquée dans plusieurs mécanismes cellulaires: la prolifération, la différenciation, l'apoptose, et la migration cellulaire (Hynes 1990). La FN est sécrétée par les cellules sous la forme d'un dimère formé de deux sous-unités identiques de 250 kDa reliées par un pont disulfure du côté C-terminal. La FN plasmatique, synthétisée dans le foie par les hépatocytes, reste dans un état dimérique alors que la FN "cellulaire", qui est synthétisée localement dans les tissus, se présente principalement sous la forme d'un réseau fibrillaire complexe et insoluble au déoxycholate (Hynes 1990).

La FN est composée de trois types de modules répétés (I, II, et III) et elle contient 12 domaines de type I, deux de type II et 15 à 17 de type III selon l'épissage alternatif qu'aura subi la protéine (Hynes 1990; Pankov and Yamada 2002) (Figure 6). La FN est le produit d'un seul gène dont l'ARNm va subir des modifications par épissage alternatif pour donner naissance à 20 formes différentes de FN (Kosmehl, Berndt et al. 1996). Les principales modifications par épissage alternatif se situent au niveau des domaines III₇ et III₁₅ qui mènent à la formation des domaines EDA et EDB (ED pour *extradomain*). Une autre modification a lieu dans la région V (pour variable en longueur) ou IIICS (pour segments de type III connectés) située entre les domaines III₇ et III₁₂. Les variations de cette région sont plus complexes et dépendent de l'espèce, chez l'humain il existe cinq différentes régions V (Pankov and Yamada 2002). Dans la FN plasmatique, seulement un des 2 dimères va porter

cette région V alors que dans la FN cellulaire les 2 dimères porteront cette région (Magnusson and Mosher 1998).

Les différents modules de la FN forment des domaines de liaison pour différentes molécules de la MEC. La FN se lie à un très grand nombre de molécule dont l'héparine, le collagène/gélatine, la fibrine, le fibrinogène et le facteur XIIIa dont la liaison est importante pour l'incorporation de la FN au niveau du caillot sanguin (Barry and Mosher 1989; Magnusson and Mosher 1998). Ces interactions sont effectuées par des domaines fonctionnels et structuraux distincts qui ont été identifiés par fragmentation protéolytique ou par l'analyse de recombinants (Barry and Mosher 1989; Pankov and Yamada 2002).

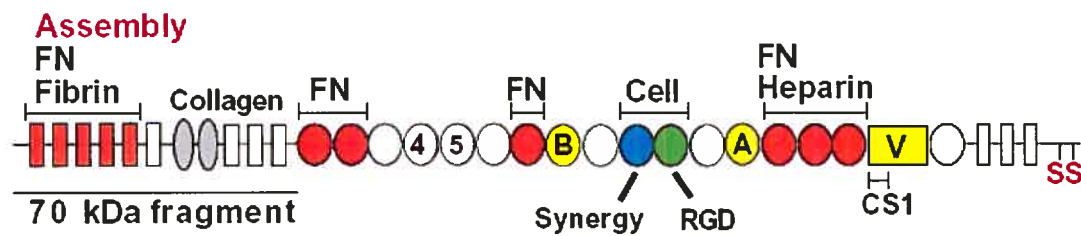


Figure 6: Les différents domaines de la fibronectine (FN). La FN est composée de modules répétés de type I (rectangles), type II (ovales) et de type III (cercles). La répétition de ces modules forme des domaines de liaison pour différentes protéines comme la fibrine, la FN elle-même, le collagène, l'héparine et les cellules comme indiqué sur le dessin. La FN comporte trois domaines d'épissage alternatif EIIIA, EIIIB et V (ou IIICS) indiqués en jaune. Les sites d'assemblage des dimères de FN sont en orange. Le signe SS indique le pont disulfure qui relie les deux monomères en un dimère. Figure extraite de l'article (Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer 2003).

1.2 Rôle dans l'adhésion et la motilité cellulaire

1.2.1 Les intégrines

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires ubiquitaires impliquées dans les interactions cellule-cellule et cellule-MEC (Hynes 1992). Les intégrines sont des hétérodimères constitués de deux sous-unités α et β liées de façon non covalente. Il existe 18 différentes sous-unités α et 8 différentes sous-unités β qui s'assemblent en 24 hétérodimères différents. Chaque intégrine se lie à un certain nombre de ligands avec une spécificité propre. Les intégrines font le lien entre le cytosquelette d'actine et l'environnement extracellulaire. En possédant à la fois un ligand intra et extracellulaire, les intégrines constituent un lien transmembranaire pour la transmission bidirectionnelle de forces mécaniques et de signaux biochimiques à travers la membrane plasmique.

La conformation des intégrines subit des changements rapides et réversibles au cours de son activation (Woodside, Liu et al. 2001). Les intégrines qui sont dans un état inactif de faible affinité nommé "resting" sont converties vers un état de sensibilisation ou "priming" qui permet la liaison du ligand, puis un état activé de haute affinité pour le ligand dans lequel le ligand est lié à l'intégrine, et qui peut présenter différentes affinités (Calderwood 2004; Humphries, Travis et al. 2004; Mould and Humphries 2004). La capacité de liaison du ligand de l'intégrine est contrôlée à la fois par des facteurs cytoplasmiques qui induisent des changements de conformation du domaine intracellulaire de l'intégrine et par la régulation de la conformation de la partie extracellulaire de l'intégrine qui module l'affinité de la liaison de l'intégrine pour son ligand. L'interaction des intégrines avec leur ligand est

dépendante de cations divalents comme le Mg^{2+} et le Mn^{2+} qui stabilisent la conformation de haute affinité des intégrines. Le calcium a par contre un effet inhibiteur car il stabilise la conformation de faible affinité des intégrines.

De nombreux changements de conformation ont été suggérés pour expliquer le transfert du signal à travers la molécule d'intégrine vers son domaine extracellulaire et la régulation de la liaison. L'étude de la structure cristalline de la partie extracellulaire de l'intégrine a révélé qu'elle était constituée d'une tête ovoïde avec deux jambes (Xiong, Stehle et al. 2001). Les jambes de l'intégrine dans son état inactif seraient assez rapprochées et dans une conformation pliée (Lu, Takagi et al. 2001; Xiong, Stehle et al. 2001; Kim, Carman et al. 2003). La sensibilisation de l'intégrine nécessiterait d'une part une séparation spatiale significative des jambes de l'intégrine et d'autre part son dépliement vers une conformation étendue qui permettrait au domaine de liaison du ligand, qui se trouve à l'interface entre le sommet des domaines globulaires des intégrines, d'entrer en contact avec son ligand (Lu, Takagi et al. 2001; Xiong, Stehle et al. 2002; Kim, Carman et al. 2003; Mould, Symonds et al. 2003). La séparation des jambes de l'intégrine serait associée à la fois à la sensibilisation et à l'activation de l'intégrine (Kim, Carman et al. 2003). Des études ont montré que cette forme pliée de l'intégrine présentait une faible affinité pour les ligands biologiques et que l'addition d'un ligand de haute affinité ou du Mn^{2+} induisait un dépliement de la structure et un changement de conformation de la structure globulaire (Beglova, Blacklow et al. 2002; Takagi, Petre et al. 2002). De plus, la rupture de la liaison entre les sous-unités α et β qui entraîne la séparation des domaines cytoplasmiques de l'intégrine augmente le dépliement de la partie extracellulaire induit par le Mn^{2+} et la liaison du ligand (Takagi, Petre

et al. 2002). L'étude de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ a montré que la séparation spatiale des domaines cytoplasmiques et/ou transmembranaire induisait une augmentation de la liaison à la FN indépendamment du regroupement des molécules d'intégrines (Takagi, Erickson et al. 2001). De plus la mise au point d'un anticorps monoclonal SNAKA51 qui reconnaît spécifiquement l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ exprimée au niveau des fibrilles d'adhésion associées avec la matrice de FN renforce l'idée que l'intégrine activée peut adopter différentes conformations liée à son affinité et à sa fonction (Clark, Pankov et al. 2005).

L'activation de l'intégrine $\beta 1$ va entraîner l'activation de la protéine FAK, une tyrosine kinase cytoplasmique, par autophosphorylation au niveau de son résidu tyrosine 397 (tyr-397) (Schaller, Hildebrand et al. 1994). L'autophosphorylation de FAK sur la tyr-397 est un élément clé dans la fonction biologique de FAK car il crée un site de liaison de haute affinité pour les protéines qui possèdent un domaine SH2, dont les protéines kinases de la famille Src (c-Src, Fyn) (Cobb, Schaller et al. 1994; Schaller and Parsons 1994; Xing, Chen et al. 1994) qui jouent un rôle majeur dans la voie de signalisation des intégrines (Cary, Klinghoffer et al. 2002).

Après leur liaison à la tyr-397 phosphorylée, les kinases de la famille src vont phosphoryler FAK sur ses autres résidus tyrosine (Schlaepfer, Hanks et al. 1994; Calalb, Polte et al. 1995; Calalb, Zhang et al. 1996). La phosphorylation des tyr-576 et 577 va augmenter l'activation de FAK (Calalb, Polte et al. 1995) et la phosphorylation de la tyr-927 va donner un site de liaison pour le domaine SH2 de Grb2, qui peut induire l'activation de ERK via la voie de Ras (Schlaepfer, Hanks et al. 1994).

L'autophosphorylation de FAK sur la tyr-397 va permettre la liaison et l'activation de la PI3-K (Chen, Appeddu et al. 1996), qui va activer la voie de Akt/PKB (Sonoda, Matsumoto et al. 2000). FAK va également activer des composants des contacts focaux comme la paxilline (Richardson, Malik et al. 1997) et les protéines adaptatrices Grb7 (Han and Guan 1999), Grb2 et p130cas (Schlaepfer and Hunter 1996; Schlaepfer, Hauck et al. 1999).

L'activation de p130cas et la PI3-K sont des éléments clé dans l'activation de la motilité cellulaire par les intégrines (Cary, Han et al. 1998; Kiyokawa, Hashimoto et al. 1998; Kiyokawa, Hashimoto et al. 1998; Klemke, Leng et al. 1998 ; Reiske, Kao et al. 1999). P130cas activé va recruter CrkII et DOCK180 et activer la petite GTPase Rac1 ainsi que la cascade de la JNK, le remodelage du cytosquelette d'actine et la migration cellulaire (Vuori, Hirai et al. 1996; Dolfi, Garcia-Guzman et al. 1998).

Les intégrines vont être impliquées dans différentes voies de signalisation intracellulaires qui vont réguler l'expression des gènes, les niveaux de pH et de calcium intracellulaires, le métabolisme des phospholipides et l'activité des petites GTPases, des kinases et des phosphatases (Schwartz, Schaller et al. 1995; Schlaepfer, Hauck et al. 1999; Miranti and Brugge 2002). L'activation de ces voies va produire une réponse inside-out qui va moduler la liaison de l'intégrine avec son ligand extracellulaire (Takagi, Erickson et al. 2001; Woodside, Liu et al. 2001).

1.2.2 Les structures d'adhésion

Les structures d'adhésion sont des complexes protéiques organisés autour des intégrines. Elles se forment et se modifient au cours de l'étalement, de

l'adhésion, et de la migration des cellules (Katz, Zamir et al. 2000; Riveline, Zamir et al. 2001; Zamir and Geiger 2001).

Elles regroupent une multitude de protéines différentes incluant des protéoglycans comme le syndécan-4 (Woods and Couchman 1994), des protéines de nucléation et de pontage de l'actine (la vinculine, la tensine, la paxilline, la taline, α -actinine, la parvine/actopaxine et le complexe protéique ERM et de nombreuses molécules de signalisation: des tyrosines kinases (des kinases de la famille de Src, la FAK, PYK2, Csk et Abl), des sérine/thréonine kinases (ILK, PKC et la PAK), des modulateurs des petites GTPases (ASAP1, Graf et PSGAP) et des tyrosines phosphatases (SHP-2 et LAR PTP) et d'autres protéines comme la PI3-K et la protéase calpain II (Zamir and Geiger 2001). L'expression de certaines de ces protéines est toutefois spécifique de certains types cellulaires (Zamir and Geiger 2001).

Il existe différents types de structure d'adhésion liées à l'adhésion et à la migration des fibroblastes en culture: les complexes focaux, les adhésions focales et les fibrilles d'adhésion.

Les premiers sites d'adhésion à l'actine sont des structures de 1- μ m de diamètre qui sont localisées à l'avant du lamellipode des cellules motiles (Geiger, Bershadsky et al. 2001). Ces petites structures sont nommées complexes focaux. Elles contiennent beaucoup de protéine phosphorylées, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, la taline, la paxilline mais elles présentent un faible taux de vinculine et de FAK et sont apparemment dépourvues de zyxine et de tensine (Zaidel-Bar, Ballestrem et al. 2003; Zimmerman, Volberg et al. 2004). Les complexes focaux sont les précurseurs

des adhésions focales qui sont les structures d'adhésion dites classiques (Geiger and Bershadsky 2001). Les complexes focaux se développent en contacts focaux après l'activation de la petite GTPase RhoA (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge 1996; Clark, King et al. 1998; Rottner, Hall et al. 1999) ou après l'application de forces externes (Riveline, Zamir et al. 2001).

Les structures d'adhésions focales sont des structures d'adhésion très fortes entre le cytosquelette d'actine et la MEC (Geiger and Bershadsky 2001; Geiger, Bershadsky et al. 2001). Dans les fibroblastes, ce sont des structures ovales, périphériques, enrichies en intégrine $\alpha v \beta 3$, en protéines phosphorylées sur tyrosine, contenant la vinculine, la paxilline et la taline (Katz, Zamir et al. 2000). Une fois que ces structures sont stables et matures elles vont servir de point d'ancrage à la formation d'un troisième type de structure: les fibrilles d'adhésion (Zamir, Katz et al. 1999; Pankov, Cukierman et al. 2000)

Les fibrilles d'adhésion sont des structures allongées et situées de façon plus centrale dans la cellule. Elles sont enrichies en intégrines $\alpha 5 \beta 1$, en tensine, parvine/actopaxin et en FN mais ne présentent pas de marquage de la paxilline, de la vinculine et des phosphotyrosines (Zamir, Katz et al. 1999). Elles sont formées par le mouvement centripète de la FN et des intégrines $\alpha 5 \beta 1$ le long des fibres de stress d'actine depuis les contacts focaux d'adhésion à la périphérie de la cellule, vers le centre de la cellule (Pankov, Cukierman et al. 2000). La formation de cette structure est impliquée dans l'assemblage de la matrice de FN (Pankov, Cukierman et al. 2000).

1.2.3 La motilité cellulaire

La locomotion des fibroblastes en culture est générée par le cycle répété d'extension de "protrusions" membranaires vers l'avant de la cellule, la formation de nouveaux sites d'adhésion avec la MEC et le détachement et la rétraction de l'arrière de la cellule (Figure 7) (Abercrombie, Heaysman et al. 1970; Lauffenburger and Horwitz 1996; Klass, Couchman et al. 2000).

Ces événements s'effectuent grâce à de nombreux changements au niveau du cytosquelette d'actine et par la formation transitoire de structures d'adhésion (Yamada and Miyamoto 1995; Holly, Larson et al. 2000; Pollard, Blanchoin et al. 2000). Les petites unités de la famille Rho sont impliquées dans ces mécanismes (Ridley 2001). L'activation de RhoA, Rac1 et Cdc42 mène respectivement à la formation de fibres de stress d'actine, de lamellipodes et de filopodes (Ridley, Paterson et al. 1992; Nobes and Hall 1995). Elles sont aussi impliquées dans la formation et la maturation des contacts focaux d'adhésion et dans la traction du corps cellulaire (Nobes and Hall 1999; Geiger and Bershadsky 2001).

L'extension du lamellipode est permise par le recyclage polarisé de la membrane plasmique (Martenson, Stone et al. 1993; Bretscher 1996), d'ARNm codants pour l'actine (Bassell and Singer 1997) et de protéines qui lient l'actine vers le bord avant de la cellule. L'actine sera alors polymérisée en un réseau de filaments formés par l'activité des complexes protéiques Wasp/Scars qui vont pousser la membrane vers l'avant (Pollard, Blanchoin et al. 2000) sous le contrôle des petites unités de la famille Rho (Miki, Suetsugu et al. 1998; Rudolph, Bayer et al. 1998).

Les structures d'adhésion vont servir de point d'ancrage pour les fibres de stress d'actine, des structures temporaires contractiles constituées de filaments d'actine et de myosine II qui vont générer des forces de tension sous le contrôle de la petite GTPase RhoA (Geiger and Bershadsky 2001). L'activation de la kinase Rho va phosphoryler et inactiver la myosine phosphatase et ainsi permettre à la chaîne légère de la myosine de rester phosphorylée et de générer des force en s'associant aux filaments d'actine (Kimura, Ito et al. 1996). Ces forces vont permettre la traction du corps cellulaire (Schoenwaelder and Burridge 1999).

La perte des contacts focaux d'adhésion à l'arrière de la cellule va permettre sont détachement. La calpaine qui est une protéase dépendante du calcium (Beckerle, Burridge et al. 1987) est impliquée dans le *turn-over* des contacts focaux. Elle lyse le domaine cytoplasmique de l'intégrine $\beta 3$ (Du, Saido et al. 1995; Schoenwaelder, Yuan et al. 2000) et la taline (Bialkowska, Kulkarni et al. 2000). La protéine tyrosine phosphatase-PEST (PT-PEST) qui se lie à la paxilline (Shen, Schneider et al. 1998; Cote, Turner et al. 1999) au niveau des contacts focaux d'adhésion (Turner 2000) va aussi favoriser la dissolution des contacts focaux d'adhésion (Angers-Loustau, Cote et al. 1999) en déphosphorylant p130cas (Angers-Loustau, Cote et al. 1999).

Les cellules tumorales vont produire des enzymes protéolytiques qui vont dégrader les protéines de la MEC pour favoriser leur migration (Nelson, Fingleton et al. 2000). Ces endopeptidases sont des métalloprotéases matricielles (MMPs). Certaines sont sécrétées par la cellule d'autres qui possèdent un domaine transmembranaire sont exprimées à la surface des cellules, les MT-MMPs (*matrix-type metalloprotease*) (Sato and Seiki 1996).

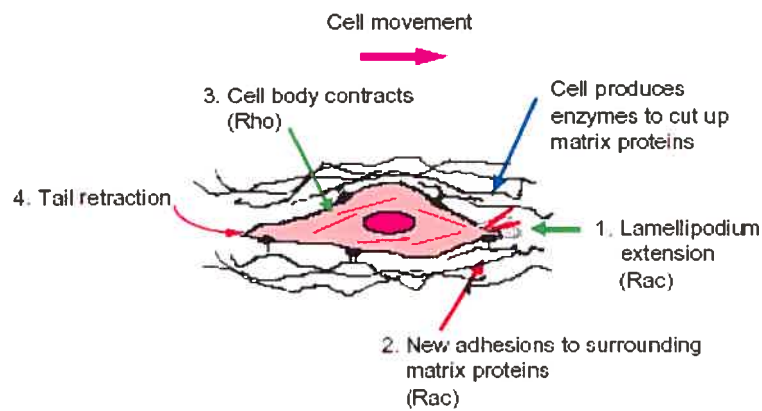


Figure 7: La migration cellulaire. La cellule migratrice étend ses lamellipodes vers l'avant de la cellule (1). Cette extension est stabilisée par la formation de nouvelles structures d'adhésion avec la MEC (2). Le corps de la cellule bouge par une contraction effectuée par les fibres de stress d'actine (3). Finalement la queue de la cellule se détache du substrat et se rétracte (4). Un autre point important de la migration cellulaire est que les cellules migratrices sécrètent également des protéases qui coupent les protéines de la MEC. Figure tirée de l'article (Ridley 2001).

1.3 L'assemblage de la matrice de fibronectine

L'assemblage de la matrice FN est essentiel à la migration des cellules au cours de l'embryogenèse et à la réparation des tissus (Hynes 1990; George, Georges-Labouesse et al. 1993). Contrairement à d'autres polymères biologiques comme le collagène, la laminine, l'actine et la tubuline, la FN ne s'autopolymérise pas en solution. L'assemblage de la FN est un mécanisme complexe qui permet l'assemblage de dimères solubles de FN en un réseau fibrillaire dense insoluble au déoxycholate (McKeown-Longo and Mosher 1983). La matrice de FN est organisée par les cellules qui la synthétisent, la dégradent, l'endocytent et la réarrangent pour obtenir un dense réseau de fibrilles interconnectées qui procure un environnement dynamique à la cellule (Hynes 1999). Les fibrilles de FN se forment uniquement à la surface des cellules grâce à l'activité de certains récepteurs membranaires comme les intégrines et les syndécans (Mosher 1995; Woods and Couchman 2001). Cette régulation protège l'organisme contre la formation de fibrilles de FN dans la circulation sanguine provenant de la FN circulante.

1.3.1 Le rôle des intégrines et des structures d'adhésion

La FN se lie à une douzaine de type d'intégrines différentes (Plow, Haas et al. 2000). L'intégrine qui interagit le plus souvent avec la FN est l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, cette liaison est impliquée dans la fibrillogénèse de la FN (Wennerberg, Lohikangas et al. 1996). La transfection de cellules CHO avec l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ stimule l'assemblage de la matrice de FN (Wu, Bauer et al. 1993) alors que les anticorps monoclonaux dirigés contre $\alpha 5$ ou $\beta 1$ inhibent son assemblage (Fogerty, Akiyama et al. 1990). L'expression d'une chimère contenant le domaine cytoplasmique de l'intégrine $\beta 1$ et

la forme tronquée de l'intégrine $\beta 1$ agissent comme des dominants négatifs de la fibrillogénèse de la FN (LaFlamme, Thomas et al. 1994; Wu, Keivens et al. 1995). Cette interaction s'effectue au niveau de la séquence Arg-Gly-Asp (RGD) du domaine III₁₀ de la FN (Ruoslahti and Pierschbacher 1987; Hynes 1992) et par le domaine "synergique" dont la séquence est Pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN) qui est localisée dans le module adjacent III₉ de la FN (Nagai, Yamakawa et al. 1991). L'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ peut également se lier aux domaines I₁₋₉ et II₁₋₂ de la région N-terminale. Les intégrines $\alpha v \beta 3$ et $\alpha I I b \beta 3$ lient aussi le domaine RGD et initie la fibrillogénèse dans les cellules CHO (Wu, Keivens et al. 1995; Wu, Hughes et al. 1996).

D'autres mécanismes de liaison indépendants du domaine RGD ont été décrit. Des études effectuées sur des cellules extraites des souris *knock-out* pour l'intégrine $\alpha 5$ ont montré que d'autres molécules étaient capables de substituer le rôle de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ dans la formation de la matrice de FN (Yang, Rayburn et al. 1993). La surexpression des intégrines $\alpha 4 \beta 1$ dans les cellules CHO déficientes pour $\alpha 5$ (qui ne forment pas de fibrilles de FN) permet d'initier la fibrillogénèse de la FN indépendamment du domaine RGD via sa liaison à la région épissée alternativement V (Sechler, Cumiskey et al. 2000).

Toutefois, la liaison de l'intégrine avec la FN n'est pas toujours suffisante pour initier la fibrillogénèse de la FN. L'étude de souris *knock-out* pour $\beta 1$ a montré que les intégrines $\alpha v \beta 3$ étaient capables de se lier à la FN mais formaient peu de fibrilles de FN (Wennerberg, Lohikangas et al. 1996). L'intégrine $\alpha v \beta 1$ favorise l'adhésion des cellules à un substrat de FN sans pourtant permettre la fibrillogénèse de la FN (Zhang, Morla et al. 1993; Wu, Keivens et al. 1995).

La FN dimérique est soluble et présente une conformation repliée qui empêche son assemblage sous la forme de fibrilles (Rocco, Carson et al. 1983). La liaison des dimères de FN avec les intégrines, distribuées de façon diffuse à la surface de la cellule, va provoquer d'une part le regroupement des intégrines au niveau des contacts focaux d'adhésion et d'autre part le dépliement du dimère de FN et l'exposition de domaines cryptiques impliqués dans la liaison des molécules de FN entre elles (Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer 2003). Les changements de conformation du dimère de FN au moment de son incorporation aux fibrilles de FN ont été montrés grâce à la technique de transfert d'énergie par fluorescence (FRET) (Baneyx, Baugh et al. 2001).

La FN possède quatre sites cryptiques qui permettent la liaison des dimères de FN entre eux. Chacun de ces sites interagit avec le domaine N-terminal de 70 kDa aussi nommé domaine d'assemblage de la FN. Ce domaine d'assemblage interagit avec les domaines III₁₋₂, III₁ (dénaturé par la chaleur), III₁₂₋₁₄ (le domaine de liaison à l'héparine), et avec une combinaison des domaines III₁₋₂ et III₁₀ dénaturés (Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer 2003). Des interactions ont aussi été observées entre les domaines III₁ et III₇ et les domaines III₁₂₋₁₄ et III₂₋₃ (Pankov and Yamada 2002). Toutefois, l'ordre dans lequel s'effectuent ces liaisons *in vivo* n'a pas encore été déterminé.

L'organisation des structures d'adhésion est impliquée dans la fibrillogénèse de la FN. La translocation de la FN le long des fibrilles d'adhésion permet l'allongement des fibrilles de FN par l'ajout de nouveaux dimères de FN au niveau des contacts focaux d'adhésion et/ou le long de la fibrille de FN (Pankov, Cukierman

et al. 2000; Zamir, Katz et al. 2000; Ohashi, Kiehart et al. 2002). Ce mécanisme semble dépendre de l'expression de la tensine et de FAK (Pankov, Cukierman et al. 2000; Ilic, Kovacic et al. 2004). L'expression de la forme dominante négative de la tensine inhibe la translocation des intégrines le long des fibrilles d'adhésion et la fibrillogénèse de la FN sans affecter la formation des contacts focaux d'adhésion (Pankov, Cukierman et al. 2000). L'expression de la protéine FAK joue un rôle très important dans la fibrillogénèse de la FN. *In vivo*, la perte de son expression est létale au niveau embryonnaire (Furuta, Ilic et al. 1995) comme c'est le cas de la FN (George, Georges-Labouesse et al. 1993). *In vitro*, la perte de son expression inhibe la fibrillogénèse de la FN (Ilic, Kovacic et al. 2004). Les protéines effectrices de la voie de signalisation de FAK, Src et PI3-K (Schlaepfer, Hauck et al. 1999), sont impliquées dans les étapes précoces de la fibrillogénèse de la FN. Les cellules SYF qui n'expriment pas la kinase Src et les cellules traitées avec des inhibiteurs de Src et de PI3-K montrent une nette diminution de l'assemblage de la MEC de FN et de l'incorporation du domaine N-terminal de 70 kDa à la matrice (Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer 2002).

1.3.2 Le rôle du cytosquelette d'actine

La fibrillogénèse de la FN est un mécanisme qui nécessite l'intervention active de la cellule. La tension que la cellule va appliquer sur les fibrilles de FN via les intégrines va permettre d'augmenter l'incorporation des dimères dans la matrice (Wu, Keivens et al. 1995).

Les petites unités de la famille Rho régulent l'organisation du cytosquelette d'actine mais aussi la fibrillogénèse de la FN (Zhang, Checovich et al. 1994). La stimulation de la petite GTPase Rho-A par l'acide lysophosphatitique, la

microinjection de la forme recombinante de Rho constitutivement active, ou un traitement des cellules avec le nocodazole (drogue qui dépolymérise les microtubules) aura pour effet de stimuler à la fois la formation des fibres de stress d'actine via la voie de contraction acto-myosine et la fibrillogénèse de la FN (Zhang, Checovich et al. 1994; Zhang, Magnusson et al. 1997; Zhong, Chrzanowska-Wodnicka et al. 1998). De la même façon l'expression de la C3 transférase, qui inhibe la petite GTPase Rho, va inhiber la liaison des dimères de la FN et du domaine de N-terminal de 70 kDa sans vraiment affecter l'activation des intégrines (Zhong, Chrzanowska-Wodnicka et al. 1998). La contraction induite par l'activation de la petite GTPase RhoA favoriserait l'ajout de nouveaux dimères de FN à la matrice en générant des tensions qui permettent leur dépliement et l'exposition de leurs sites cryptiques de liaison. L'utilisation d'une FN-GFP (FN recombinante liée à une *green fluorescent protein*) a montré que les fibrilles de FN sont élastiques et étirables et que la cellule applique des tensions sur la FN (Ohashi, Kiehart et al. 1999).

1.3.3 Le rôle des protéoglycans

La fibrillogénèse de la FN est également liée à l'expression des protéoglycans (Chung and Erickson 1997) et en particulier à celle des syndécans qui sont des protéoglycans transmembranaires qui lient la FN (Mercurius and Morla 2001). Le Syndécan-2, qui est le syndécan principalement exprimé par les fibroblastes, semble avoir un effet régulateur sur la fibrillogénèse de la FN (Klass, Couchman et al. 2000). L'expression d'un mutant de syndécan-2, dont une partie de la queue cytoplasmique est tronquée, a un effet dominant négatif sur la formation de

la matrice de FN et de laminine (Klass, Couchman et al. 2000). Le Syndécan-4 semble jouer un rôle plus direct sur la fibrillogénèse de la FN. Il coopère avec les intégrines pour réguler l'adhésion cellulaire de façon dépendante de Rho, l'étalement et l'organisation du cytosquelette d'actine (Saoncella, Echtermeyer et al. 1999). La liaison de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ avec syndécan-4 augmente l'activité de Rho et l'état de phosphorylation de FAK (Wilcox-Adelman, Denhez et al. 2002). Syndécan-4 peut aussi agir sur la PKC via la liaison de son domaine cytoplasmique (Horowitz and Simons 1998). L'activation de la PKC par des facteurs de croissance comme l' EGF et TGF- β stimule la fibrillogénèse de la FN (Lee, Park et al. 1996; Kaiura, Itoh et al. 1999).

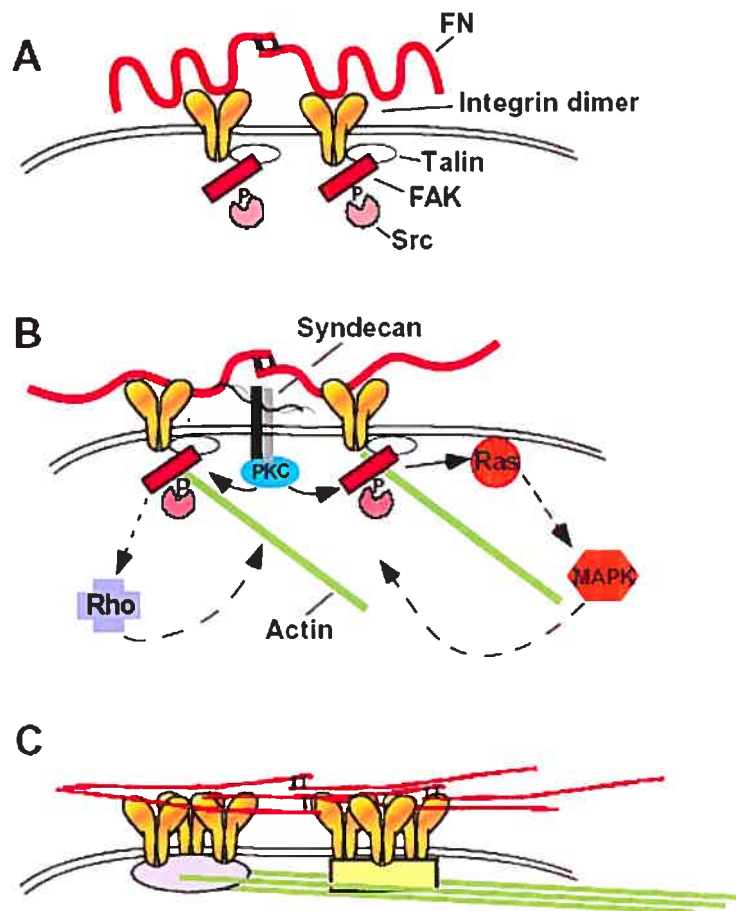


Figure 8: Représentation schématique d'un modèle d'assemblage de la matrice de fibronectine (FN). (A) La liaison du dimère de FN au niveau des intégrines distribuées de façon diffuse à la surface des cellules provoque le regroupement des intégrines au niveau de complexe d'adhésion et la colocalisation avec différentes protéines comme la taline (ovale blanc) et la *focal adhesion kinase* (FAK) (rectangle rouge). L'autophosphorylation de FAK recrute la protéine de signalisation intracellulaire Src (le cercle rose), ces deux kinases régulent les étapes précoces d'assemblage. (B) Le regroupement des intégrines et son rapprochement avec les syndécans (les barres noires et grises) sont associés avec l'organisation du cytosquelette d'actine (la ligne verte) et l'activation de molécules de signalisation incluant Ras/MAP kinase (orange), les Rho GTPase (violet) et la PKC (bleu). Les voies de signalisation renforcent l'organisation du cytosquelette d'actine et des complexes focaux d'adhésion. Les forces contractiles aident à convertir les dimères de FN repliés inactifs compacts en dimères de FN dépliés actifs dont les sites cryptiques sont accessibles. (C) La

concentration des dimères de FN actifs au niveau des sites de regroupement des intégrines favorise l'interaction entre les molécules de FN et l'assemblage des fibrilles. La colocalisation de syndécan-4 avec les points focaux d'adhésion va augmenter le niveau d'activité de la petite protéine G RhoA et de la protéine PKC et renforce la fonction des points focaux d'adhésion. Beaucoup de ces voies de signalisation semblent retourner aux intégrines (feed back) renforçant les connections entre le recrutement de composants supplémentaires et l'activation de signaux. Ensemble, la combinaison de l'activation du cytosquelette d'actine et des signaux intracellulaires, permettent la formation des fibrilles de FN à la surface de la cellule. Au fur et à mesure que les fibrilles de FN s'allongent et que des dimères de FN sont incorporés aux fibrilles, les composants intracellulaires se redistribuent entre les points focaux d'adhésion et les fibrilles d'adhésion. En culture, ces deux types de structures d'adhésion se différencient par la présence de la paxilline (ovale rose) versus celle de la tensine (rectangle jaune). La complexité de la matrice provient, en partie, des nombreux partenaires de liaison de la FN qui permettent l'option de différents types d'alignement pour les dimères qui donnent des variations dans la combinaison et l'organisation des fibrilles. Figure extraite de l'article (Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer 2003).

2 L'AMF/PGI ET SON RÉCEPTEUR L'AMF-R

2.1 L'AMF/PGI

L'AMF est une cytokine qui fut initialement identifiée dans le milieu conditionné de cellules A2058 de mélanomes humains. Elle fut caractérisée pour ses capacités à induire la migration des cellules tumorales de façon autocrine et paracrine en se liant à son récepteur l'AMF-R (Liotta, Mandler et al. 1986; Silletti, Watanabe et al. 1991; Watanabe, Carmi et al. 1991).

Des études ont par la suite démontré que l'AMF était une *moonlighting protein*, une protéine dont la fonction changeait avec sa localisation cellulaire (Jeffery 1999). En effet, l'AMF possède la même séquence codante que la PGI aussi nommée phosphohexose isomérase (PHI), la neuroleukine (NLK) et le facteur de maturation (MF) (Chaput, Claes et al. 1988; Faik, Walker et al. 1988; Watanabe, Takehana et al. 1996; Xu, Seiter et al. 1996; Niinaka, Paku et al. 1998). La PGI est une enzyme glycolytique cytosolique qui catalyse la conversion du glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate au cours de la glycolyse. La NLK est un facteur neurotrophique qui favorise la croissance et la survie des neurones spinaux et sensoriels ainsi que des lymphocytes B (Gurney, Apatoff et al. 1986), et MF induit la différenciation des cellules myéloïdes humaines en monocytes terminaux (Xu and Chiao 1996). Et plus récemment, l'AMF a été identifiée comme étant un inhibiteur de sérine protéinase liée aux myofibrilles (Cao, Osatomi et al. 2000). L'AMF possède donc différentes fonctions déterminées par son environnement.

2.1.1 La structure de l'AMF/PGI

L'AMF/PGI est une enzyme exprimée de façon ubiquitaire, d'un poids moléculaire apparent de 55 kDa et de 64 kDa en conditions non dénaturantes et dénaturantes respectivement (Silletti, Watanabe et al. 1991).

Les structures cristallographiques de la PGI de mammifère et de bactérie *Bacillus stearothermophilus* montrent que le site actif de l'enzyme a été conservé au cours de l'évolution (Sun, Chou et al. 1999; Chou, Sun et al. 2000), les différences existantes se situent surtout au niveau des régions plus périphériques de la protéine (Arsenieva, Hardre et al. 2002; Tanaka, Haga et al. 2002).

La PGI de lapin, comme l'AMF endogène, stimule la motilité des cellules transformées en se liant à son récepteur (Le, Benlimame et al. 2000; Amraei and Nabi 2002). La motilité induite par l'activité cytokine de l'AMF/PGI est inhibée par les inhibiteurs de l'activité enzymatique de la PGI, les phosphates de carbohydrates, le 5PA et le BAP (Watanabe, Takehana et al. 1996; Chou, Sun et al. 2000). Ce qui suggère que le site de liaison des sucres doit être à proximité du site enzymatique de la PGI.

Toutefois, seule la PGI de mammifère possède une activité cytokine. Les PGI de bactérie et de levure ne font pas compétition au niveau de la liaison de la PGI de mammifère avec son récepteur l'AMF-R et seule la PGI de mammifère est endocytée par les cellules NIH-3T3 (Amraei and Nabi 2002). Le site actif ne semble donc pas être suffisant pour donner à la protéine son activité cytokine et cette activité paraît être spécifique de la PGI de mammifère (Amraei and Nabi 2002). Une autre étude avait déjà démontré que la PGI bactérienne pouvait stimuler la motilité des cellules CT-26 (Sun, Chou et al. 1999; Chou, Sun et al. 2000). Cette différence pourrait être expliquée par l'utilisation de différentes lignées cellulaires. L'utilisation d'une protéine recombinante de la PGI, qui a perdu son activité enzymatique, a

montré que la perte de l'activité enzymatique de la protéine n'affectait pas sa liaison à son récepteur ni son activité de cytokine (Tsutsumi, Gupta et al. 2003). Ces résultats, obtenus avec une technique plus spécifique que l'utilisation d'inhibiteur (Watanabe, Takehana et al. 1996; Chou, Sun et al. 2000), confirment que l'activité enzymatique de la PGI n'est pas essentielle à sa fonction de cytokine.

2.1.2 L'importance physiologique de l'AMF/PGI

Des formes mutées de la PGI ont été identifiées chez des patients atteints d'anémie hémolytique, une conséquence de la diminution de l'activité glycolytique des érythrocytes (Beutler, West et al. 1997; Kugler, Breme et al. 1998). Certaines de ces mutations sont aussi associées avec des déficiences neurologiques ce qui suggère qu'elles affectent également la fonction cytokine extracellulaire de l'enzyme (Kugler, Breme et al. 1998).

Une concentration élevée d'anticorps dirigés contre la PGI a été détectée dans le sérum et le fluide synovial chez 64% des patients atteints de la maladie de l'arthrite rhumatoïde (RA) suggérant que la PGI pourrait agir comme antigène auto-pathogénique dans cette maladie (Schaller, Burton et al. 2001; Matsumoto, Maccioni et al. 2002).

La PGI serait également impliquée dans les modes de reproduction des mammifères. Des études ont démontré un rôle de la PGI dans l'agglutination des spermatozoïdes (Yakirevich and Naot 2000) et elle serait également sécrétée par le corpus lutéum durant les étapes précoces de l'embryogenèse chez le furet (Schulz and Bahr 2003; Schulz and Bahr 2004). Les auteurs ont proposé que sa forte sécrétion par le corpus lutéum dans la circulation sanguine pourrait agir à distance au niveau du trophoblaste ou de l'utérus pour favoriser l'implantation des embryons

en agissant au niveau de la motilité et de l'invasivité des cellules embryonnaires (Schulz and Bahr 2003; Schulz and Bahr 2004).

L'augmentation de l'expression de l'AMF/PGI et de son récepteur l'AMF-R au niveau des neurones de l'hippocampe suggère que ces protéines joueraient également un rôle dans les mécanismes d'apprentissage et de mémorisation chez le rat (Leclerc, Vallée et al. 2000; Luo, Long et al. 2002). Une réduction de l'expression de la neuroleukine et de l'AMF-R est observée chez les rats plus âgés et ceux qui ont des difficultés d'apprentissage (Luo, Long et al. 2002).

2.1.3 La sécrétion de l'AMF/PGI

L'AMF/PGI est exprimée dans les cellules normales et transformées mais seules les cellules transformées surexpriment et sécrètent l'AMF (Liotta, Mandler et al. 1986; Niinaka, Paku et al. 1998). Les mécanismes de sécrétion de l'AMF sont encore peu compris car l'AMF ne possède pas de peptide signal de sécrétion et la séquence de l'ADNc de l'AMF/PGI trouvée dans les cellules normales est identique à celle trouvée dans les cellules cancéreuses ce qui suggère que sa sécrétion par des cellules néoplasiques est indépendante d'une mutation ou d'un épissage alternatif et qu'elle s'effectuerait par une voie non classique de sécrétion (Niinaka, Paku et al. 1998). Des études récentes ont démontré que l'AMF sécrétée est phosphorylée sur la sérine 185 par une protéine caséine kinase. Il a été proposé que cette phosphorylation serait associée à sa sécrétion (Haga, Niinaka et al. 2000).

2.2 Le récepteur du facteur autocrine de motilité, l'AMF-R

L'activité stimulatrice de l'AMF est permise par sa liaison à son récepteur, l'AMF-R, aussi nommé gp78, qui est une glycoprotéine de 78 kDa (Nabi, Watanabe

et al. 1990; Silletti, Watanabe et al. 1991). L'AMF-R est exprimé au niveau de la membrane plasmique des cellules et au niveau d'un sous-compartiment du réticulum endoplasmique lisse (REL), les tubules AMF-R (Abdel-Nabi, Kadry et al. 1992; Benlimame, Simard et al. 1995; Wang, Benlimame et al. 1997; Benlimame, Le et al. 1998). La nature de ce compartiment intracellulaire, fortement marqué avec des anticorps dirigés contre l'AMF-R et vers où l'AMF était endocyté (Benlimame, Le et al. 1998), a été déterminée grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre différents compartiment intracellulaires. Des études en microscopie à fluorescence ont démontrées que les tubules AMF-R sont des organelles distincts des endosomes et des lysosomes car ils ne sont pas marqués avec le récepteur de la transferrine qui marque les endosomes et avec lamp-2 qui marque les lysosomes. Les études en microscopie électronique ont démontré que l'AMF-R était concentré au niveau de tubules lisses qui étaient en prolongement avec du RER identifiés grâce à la présence des ribosomes. Toutefois, les tubules AMF-R ne colocalisaient pas avec les marquages de β -COP qui marque l'appareil de Golgi, de ERGIC-53 qui marque le RE de transition ni avec celui de la calnexine qui marque le RER (Benlimame, Simard et al. 1995; Wang, Benlimame et al. 1997) (Figure 9). Des études utilisant l'illimaquinone, une drogue qui provoque la *vésicularisation* de l'appareil de Golgi (Takizawa, Yucel et al. 1993), ont montré que dans ces conditions les tubules AMF-R adoptaient une morphologie *fenêtrée* typique du REL. Les tubules AMF-R semblent donc constituer un sous-compartiment du REL (Wang, Benlimame et al. 1997).

Les tubules AMF-R sont fortement associés aux mitochondries et cette association est régulée par la concentration calcique cytosolique (Benlimame,

Simard et al. 1995; Benlimame, Le et al. 1998; Wang, Guay et al. 2000) (Figure 9). Sachant que le REL et les mitochondries sont des compartiments cellulaires impliqués dans la régulation de l'homéostasie calcique de la cellule (Golovina and Blaustein 1997) il se pourrait que les tubules AMF-R soient des compartiments spécialisés du REL impliqués dans cette fonction.

Une étude effectuée à partir de différentes lignées de cellules de carcinomes à différents degrés de métastase a révélé qu'il existe différents types de récepteurs AMF-R qui diffèrent par leur affinité (Niinaka, Haga et al. 2002). Cette étude a mis en évidence l'expression de 2 types de récepteurs: un récepteur à haute affinité et un récepteur à faible affinité pour l'AMF. Le récepteur à faible affinité semble être lié aux mécanismes de la métastase induite par l'AMF car il est trois fois plus exprimé dans les cellules les plus invasives, alors que l'expression du récepteur à haute affinité reste constante entre les différentes lignées cellulaires étudiées (Niinaka, Haga et al. 2002).

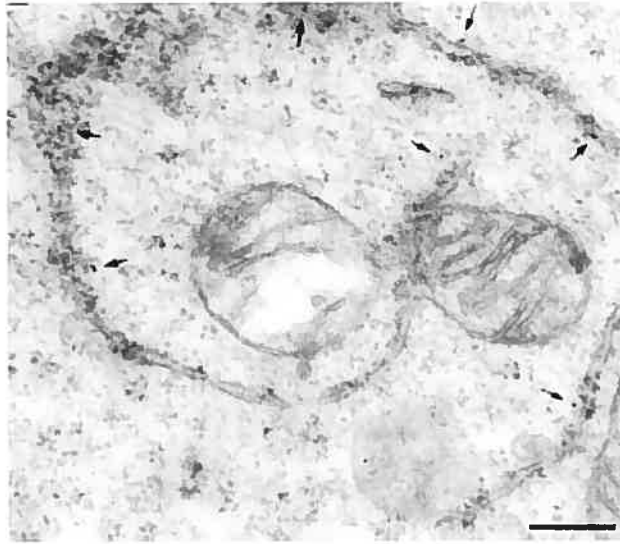


Figure 9: Image de microscopie électronique illustrant le rapprochement des tubules AMF-R avec les mitochondries. Les cellules MDCK ont été marquées en post-enrobage avec un anticorps primaire dirigé contre l'AMF-R et un anticorps secondaire portant des billes d'or. Le marquage de l'AMF-R est désigné par les flèches. Image tirée de l'article (Wang, Guay et al. 2000).

2.2.1 L'AMF-R est une ubiquitine ligase E3

La séquence codante de l'AMF-R est hautement conservée et semble coder pour une protéine à 7 domaines transmembranaires (Shimizu, Tani et al. 1999) dont la partie C-terminale contient les séquences consensus des domaines *RING finger* et *Cue* qui sont des domaines impliqués dans la voie de dégradation des protéines ubiquitinées (Fang, Ferrone et al. 2001).

La dégradation associée au RE (ERAD) est un mécanisme par lequel les protéines qui sont mal repliées ou mal assemblées durant leur biosynthèse au niveau du RE seront dégradées par le système ubiquitine/protéosome avant d'être exportées vers d'autres compartiments cellulaires (Bonifacino and Weissman 1998; Plemper and Wolf 1999). Cette dégradation nécessite l'ajout d'une chaîne d'ubiquitine sur la protéine cible. La protéine ubiquitinée sera dégradée au niveau du complexe protéique protéasome 26S (Wiertz, Tortorella et al. 1996).

L'ubiquitination implique 3 classes de protéines différentes qui vont coordonner la liaison covalente de l'ubiquitine sur des protéines cibles: E1 (*ubiquitin-activating enzymes*), E2 (*ubiquitin-conjugatin enzymes* ou ubcs) et E3 (*ubiquitin protein ligases*). Au cours du processus d'ubiquitination, E1 active l'ubiquitine d'une manière dépendante de l'ATP et forme un lien thio-ester entre un résidu glycine de l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine et E1. Ensuite, de façon séquentielle, une liaison thio-ester s'effectue entre l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine et des résidus cystéines spécifiques des enzymes E2 et E3. La dernière étape est catalysée par E3, qui lie l'extrémité C-terminale activée de l'ubiquitine à un groupe de résidus lysines ϵ -aminés de la protéine cible ou avec une autre chaîne d'ubiquitine ce qui

donne naissance à une chaîne poly-ubiquitinée. La protéine ubiquitinée sera ensuite ciblée vers le protéosome ou vers les lysosomes si c'est une protéine membranaire (Bonifacino and Weissman 1998; Plemper and Wolf 1999).

Il existe deux classes majeures de protéines E3: les protéines E3 qui possèdent un domaine HECT et celles qui possèdent un domaine *RING finger* (Hershko and Ciechanover 1998; Joazeiro and Weissman 2000; Weissman 2001). Les protéines E3 HECT acceptent l'ubiquitine de l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2 et forment une liaison thio-ester avec l'ubiquitine. L'ubiquitine est ensuite transférée à la protéine cible. A l'inverse, les protéines E3 qui possèdent un domaine *RING finger* lie E2 et semblent effectuer un transfert direct de l'ubiquitine depuis E2 vers la protéine cible.

Le domaine *Cue* (*factor for coupling of ubiquitin conjugation to ER degradation*) permet le recrutement des enzymes E1 et E2 à la membrane du RE (Biederer, Volkwein et al. 1997).

L'AMF-R exprimé au niveau des tubules AMF-R aurait une fonction de ligase E3 grâce à la présence de ses domaines *RING finger* et *Cue* qui lui ont permis de recruter la protéine E2: MmUBC7 (Fang, Ferrone et al. 2001) et de dégrader l'apolipoprotéine B100 (Liang, Kim et al. 2003). L'AMF-R serait lui aussi dégradé par la voie protéosomale via son auto-ubiquitination (Fang, Ferrone et al. 2001).

2.3 Le complexe AMF/AMF-R

La liaison de l'AMF à son récepteur l'AMF-R induit l'activation d'une protéine G trimérique sensible à la toxine pertussique (PT) (Watanabe, Carmi et al. 1991), la stimulation de la phospholipase C (Kohn, Liotta et al. 1990), de la PKC et la

production du métabolite de la lipoxigenase, le 12(S)-HETE (Timar, Silletti et al. 1993; Silletti, Timar et al. 1994). De plus, l'AMF stimulerait la phosphorylation de MEK1, MEK2 (Torimura, Ueno et al. 2001) et de JNK (JNK1 et JKN2) (Tsutsumi, Gupta et al. 2002).

Des études dans notre laboratoire ont montré que le complexe AMF/AMF-R était endocyté dans les cellules NIH-3T3 par deux voies distinctes: une voie médiée par les cavéoles et une voie médiée par des vésicules recouvertes de clathrine (Figure 11).

La première voie d'endocytose est effectuée par les cavéoles qui endocytent l'AMF vers les tubules AMF-R (Benlimame, Le et al. 1998; Le, Guay et al. 2002; Le and Nabi 2003).

Les cavéoles sont des vésicules plasmalémales lisses riches en cholestérol et en cavéoline (Couet, Belanger et al. 2001; Fielding and Fielding 2001). La dynamine est une GTPase de 100Kda impliquée, entre autres, dans les mécanismes d'endocytose médiée par les vésicules recouvertes de clathrine (van der Blik, Redelmeier et al. 1993; Damke, Baba et al. 1994) et l'internalisation des cavéoles (Henley, Krueger et al. 1998).

Le marquage de l'AMF-R a montré, que l'AMF-R exprimé à la surface des cellules, colocalisait partiellement avec la cavéoline (Benlimame, Simard et al. 1995; Le, Guay et al. 2002). De plus, l'internalisation de l'AMF vers le RE était bloquée par le m β CD (une drogue qui extrait le cholestérol et qui affecte les cavéoles (Rodal, Skretting et al. 1999)), par l'expression d'une forme dominante négative de la

dynamine, la dynK44A, et par l'expression de la cavéoline-1. Ces études ont montré que l'internalisation du complexe AMF/AMF-R vers le RE était dépendante de la voie d'endocytose des cavéoles et qu'elle était négativement régulée par la surexpression de la cavéoline-1 (Le, Benlimame et al. 2000; Le, Guay et al. 2002). La quantification du taux d'AMF a montré que l'endocytose de l'AMF vers le RE était plus importante dans les cellules transformées en comparaison avec les cellules NIH-3T3 contrôles (Le, Guay et al. 2002). Cette endocytose pourrait être impliquée dans l'acquisition des propriétés invasives qui sont liées à l'expression de l'AMF et de l'AMF-R.

La seconde voie d'endocytose est effectuée par les vésicules recouvertes de clathrine qui endocytent l'AMF vers des corps multivésiculaires (MVBs), puis le recycle vers des fibrilles de FN à la surface des cellules (Le, Benlimame et al. 2000). Les MVBs sont des compartiments intermédiaires entre les endosomes précoces et les endosomes tardifs, impliqués dans les mécanismes de recyclage des protéines membranaires (Dunn, Connolly et al. 1986; Gruenberg, Griffiths et al. 1989), qui sont facilement identifiables en microscopie électronique car ils possèdent une membrane limitante et de multiples vésicules internes (Felder, Miller et al. 1990).

Cette voie d'endocytose n'était pas sensible au traitement des cellules avec le m β CD et était inhibée par l'acidification du milieu extracellulaire et l'expression de la dynK44A. Ces observations ont permis de confirmer que cette voie d'endocytose était dépendante des vésicules recouvertes de clathrine (Le, Benlimame et al. 2000; Le, Guay et al. 2002). Les études en microscopie à fluorescence ont montré que l'AMF était endocytée vers un compartiment qui n'était pas marqué avec le récepteur

à la transferrine (endosomes précoces) (Hopkins and Trowbridge 1983), ni avec lamp-1 (endosomes tardifs) (Le, Benlimame et al. 2000). La microscopie électronique a permis d'identifier ce compartiment comme étant des MVBs (Figure 10). L'incubation des cellules à 20°C bloque le transport entre les endosomes précoces et les endosomes tardifs (Dunn, Hubbard et al. 1980; Hopkins and Trowbridge 1983) et le nocodazole est une drogue qui dépolymérise les microtubules et affecte les voies plus tardives d'endocytose (Gruenberg, Griffiths et al. 1989; Aniento, Emans et al. 1993). Le fait que le recyclage de l'AMF vers les fibrilles de FN était inhibé par l'incubation des cellules à 20°C mais pas par le nocodazole, a permis de confirmer que l'AMF recyclé à la surface des cellules provenait des MVBs et pas d'un compartiment endocytique plus tardif (Le, Benlimame et al. 2000). Il a été proposé que le recyclage de l'AMF vers la matrice de FN pourrait être impliqué dans la formation de nouveaux sites d'attachement de la cellule ou dans le remodelage de la matrice de FN au cours de la motilité cellulaire (Le, Benlimame et al. 2000).

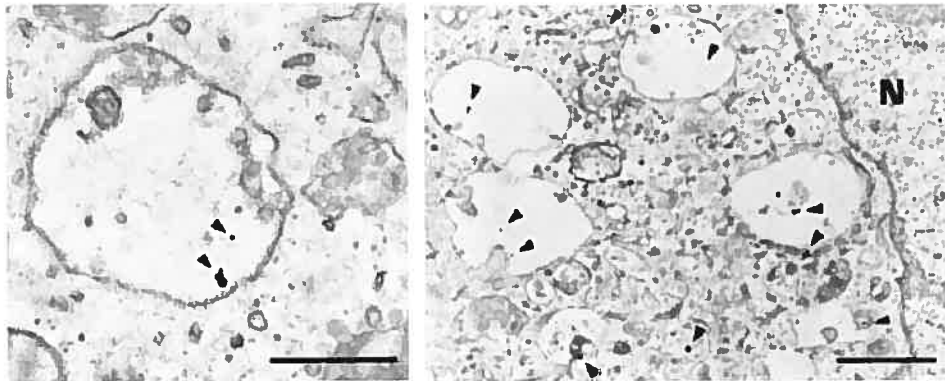


Figure 10: Microscopie électronique de l'AMF internalisé dans un corps multivésiculaire. Les cellules NIH-3T3 ont été incubées en présence d'AMF lié à de la biotine (bAMF). Les têtes de flèches désignent le bAMF qui a été marqué en post-enrobage avec de la streptavidine liée à des billes d'or. N: noyau. L'échelle: 0.5 μ m. Image tire de l'article (Le, Benlimame et al. 2000).

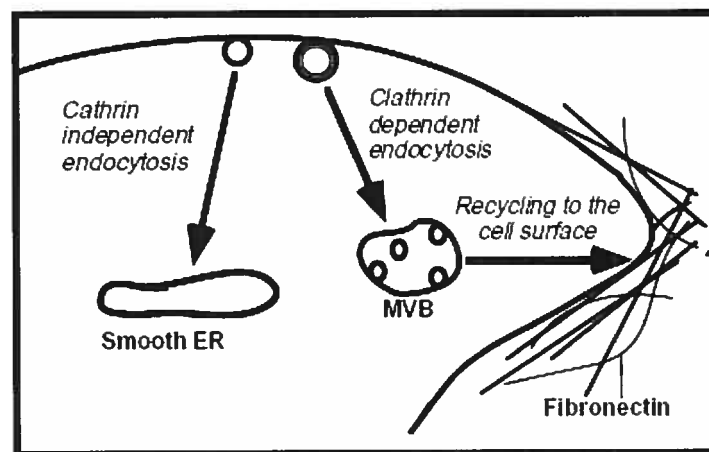


Figure 11: Les deux voies d'internalisation du complexe AMF/AMF-R. Le complexe AMF/AMF-R est internalisé par une voie indépendante des clathrines médiée par les cavéoles et une voie dépendante des clathrines vers les corps multivésiculaires et recyclé vers la matrice de FN.

2.3.1 L'importance de l'AMF et de l'AMF-R dans le cancer

L'AMF et l'AMF-R sont tous deux surexprimés dans les cellules malignes et leur niveau d'expression est associé avec la formation des tumeurs et des métastases (Watanabe, Carmi et al. 1991; Nakamori, Watanabe et al. 1994; Takanami, Takeuchi et al. 1998; Taniguchi, Yonemura et al. 1998; Takanami, Takeuchi et al. 2001; Takanami, Takeuchi et al. 2002).

La concentration d'AMF est très élevée dans le sérum et l'urine de patients atteints des cancers de la vessie, gastro-intestinal, colorectal, du sein, du poumon et du rein (Bodansky 1954; Baumann and Brand 1990; Baumann, Kappel et al. 1990; Guirguis, Javadpour et al. 1990; Filella, Molina et al. 1991; Patel, Rawal et al. 1995). Son apparition dans le sérum corrèle avec le développement de métastases et peut être utilisée comme outil de pronostic pour la détection des tumeurs malignes (Schwartz 1973; Baumann, Kappel et al. 1990; Guirguis, Javadpour et al. 1990). La surexpression de l'AMF/PGI dans les cellules NIH-3T3 induit la sécrétion de l'AMF et active la prolifération cellulaire, la transformation et la tumorigénicité chez les souris nues *in vivo* (Tsutsumi, Hogan et al. 2003). Toutefois, la stimulation de la motilité induite par la surexpression de l'AMF dépend de l'expression de l'AMF-R (Yanagawa, Watanabe et al. 2004).

L'expression de l'AMF-R corrèle avec la malignité du cancer de la vessie, du colon et des tumeurs gastriques (Nakamori, Watanabe et al. 1994; Otto, Birchmeier et al. 1994; Hirono, Fushida et al. 1996). L'expression de l'AMF-R est associée avec l'acquisition des propriétés motiles et métastasiques des cellules tumorales (Silletti, Paku et al. 1996; Takanami, Takeuchi et al. 2001; Takanami, Takeuchi et al. 2002). En culture cellulaire, l'expression de l'AMF-R est diminuée par le mécanisme

d'inhibition par contact dans les fibroblastes A31-3T3 (Silletti and Raz 1993) et augmentée après la transformation virale des cellules épithéliales MDCK (Simard and Nabi 1996).

2.3.1.1 Le rôle de l'AMF/PGI et de l'AMF-R dans la migration cellulaire

La liaison de l'AMF à son récepteur, l'AMF-R, stimule la motilité et l'invasivité des cellules tumorales de façon directionnelle ou aléatoire (Liotta, Mandler et al. 1986; Silletti, Watanabe et al. 1991; Silletti, Paku et al. 1996). Cette stimulation se traduit par une augmentation de l'expression des intégrines $\alpha 5 \beta 1$ et $\alpha IIb \beta 3$ dans les cellules métastatiques de mélanomes (Timar, Trikha et al. 1996) et de l'intégrine $\beta 1$ dans les hépatomes (Torimura, Ueno et al. 2001).

L'AMF stimule également la formation des fibres de stress d'actine via l'activation de RhoA et Rac1 mais n'agit pas sur Cdc42 dans les cellules d'hépatomes et les cellules humaines A375 de mélanome (Torimura, Ueno et al. 2001; Tsutsumi, Gupta et al. 2002).

Les MMPs sont des protéines importantes des processus migratoires et métastatiques des cellules tumorales car elles sont impliquées dans la dégradation de la MEC et de la membrane basale (Matrisian 1992). L'incubation des cellules d'hépatomes en présence d'AMF stimule la sécrétion des métalloprotéases MMP-2 et MMP-3 (Torimura, Ueno et al. 2001; Yu, Liao et al. 2004). Ce qui confirme l'importance de l'AMF dans l'induction des phénotypes métastatiques.

2.3.1.2 L'AMF/PGI favorise l'angiogenèse et protège les cellules contre l'apoptose

Lorsque les tumeurs solides grossissent, certaines zones ne sont plus irriguées par la circulation sanguine et deviennent hypoxiques (Graeber, Osmanian et al.

1996). La formation de nouveaux vaisseaux est donc requise pour la croissance des tumeurs au niveau de leurs sites primaires et secondaires et donne une porte de sortie pour la dissémination des cellules tumorales dans la circulation sanguine (Nangia-Makker, Baccarini et al. 2000). L'hypoxie favorise l'expression du facteur de transcription HIF-1 ainsi que l'induction de nombreux gènes qui régulent l'angiogenèse, la croissance des tumeurs et les métastases. Des études ont montré que dans le cas du cancer du pancréas, l'expression du gène de l'AMF/PGI était induite par l'hypoxie (Yoon, Buchler et al. 2001) et que cette expression favorisait l'angiogenèse (Funasaka, Haga et al. 2001) et aurait une activité anti-apoptotique sur les cellules tumorales (Haga, Funasaka et al. 2003).

Le VEGF est un facteur de croissance angiogénique très étudié (Veikkola, Karkkainen et al. 2000). Des études ont montré que les cellules endothéliales de veines humaines HUVEC cultivées en 3 dimensions dans un gel de collagène en présence d'AMF expriment plus de VEGF et de son récepteur le VEGF-R, et elles forment des structures tubulaires ressemblant à des capillaires (Funasaka, Haga et al. 2001; Funasaka, Haga et al. 2002). L'AMF posséderait donc également, une activité paracrine angiogénique (Funasaka, Haga et al. 2001)

Des études récentes ont montrées que l'AMF possède également une activité anti-apoptotique (Haga, Funasaka et al. 2003). En effet des études réalisées dans les cellules HT-1080 qui expriment un haut niveau d'AMF ont montré que l'AMF inhibe l'expression des gènes de Apaf-1 et de la caspase-9, deux protéines impliquées dans la cascade apoptotique reliée à la voie des mitochondries (Haga, Funasaka et al. 2003). La perte de ces facteurs apoptotiques dans les cellules cancéreuses protège ces cellules contre l'apoptose induite par l'activité de p53 (Soengas, Capodici et al. 2001). Toutefois, la régulation de l'expression des gènes

des protéines Apaf-1 et de caspase-9 semble être différente de la voie classique de l'AMF qui induit la stimulation de la protéine G sensible à la PT (qui inhibe les protéines Gi), car l'inhibition de la PT ne rétablit pas l'expression de Apaf-1 et de la caspase 9. Il semblerait que cette stimulation passe plutôt par les voies de la PKC, de la PI3-K et de la MAPK (Haga, Funasaka et al. 2003). L'AMF et l'AMF-R agissent donc à différents niveaux dans l'acquisition du phénotype métastatique des cellules.

3 MGAT5 ET LES GALECTINES

3.1 La glycosylation des protéines

La biosynthèse des oligosaccharides est un mécanisme crucial dans la biologie des cellules de mammifères, qui est requise pour le bon repliement de la protéine et la viabilité des cellules eucaryotes. La plupart des protéines sécrétées et celles exprimées à la membrane plasmique sont glycosylées. Toutefois, associer une relation structure/fonction à l'expression des glycans est compliqué par l'hétérogénéité des structures et l'abondance des différentes glycoprotéines. Les désordres congénitaux de glycosylation sont dus à des mutations hypomorphiques qui réduisent le taux de N-glycosylation. Il en résulte de multiples malformations au niveau des organes et des retards dans le développement (Carchon, Van Schaftingen et al. 1999).

Il existe deux types de glycosylation, en N et en O selon le site d'ancrage. Dans le cas des N-glycans, les sucres sont ancrés sur l'azote du groupement amide de l'asparagine alors que dans celui des O-glycans, les oligosaccharides sont liés aux groupements hydroxyl d'un résidu sérine, thréonine ou de l'hydroxylysine dans le cas du collagène. Ces deux types de structures sont très différents. Les chaînes liées en O sont plus courtes et plus variables que celles en N, et ne contiennent la plupart du temps qu'un, deux ou trois résidus glucidiques alors que les chaînes en N peuvent devenir complexes et former de véritables arborisations. Nous nous concentrerons ici sur la glycosylation en N qui commence dans la lumière du RE, en même temps que la traduction de la protéine et se continue dans l'appareil de Golgi (Kornfeld and Kornfeld 1985; Schachter 1986).

3.1.1 La N-glycosylation

L'oligosaccharide précurseur, $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-dolichol}$, maintenu à la membrane du RE par une molécule lipidique particulière, le dolichol, est composé de résidus N-acetylglucosamine (GlcNAc), de mannose (Man) et de glucose (Glc). Il est transféré en bloc aux protéines, au niveau du groupement NH_2 de la chaîne latérale d'un résidu asparagine de la protéine. Ce transfert s'effectue en une seule étape enzymatique, immédiatement après l'émergence du résidu dans la lumière du RE au cours de la translocation protéique. Le site d'attachement a une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr, où le X peut être n'importe quel acide aminé sauf la proline. Cet oligosaccharide sera ensuite élagué dans le RE (Figure 12) (Helenius and Aebi 2001).

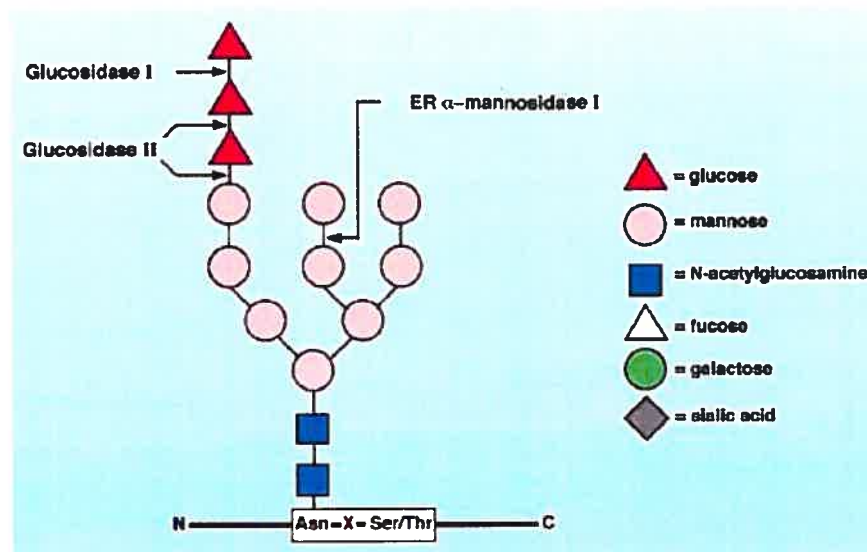


Figure 12: La maturation des oligosaccharides liés en N dans le réticulum endoplasmique. Le noyau oligosaccharique lié au résidu asparagine va subir ses premières modifications au niveau du RE. Les résidus Glucose et Mannose terminaux seront élagués du noyau d'oligosaccharide lié en N par des enzymes glucosidases et mannosidases. Figure tirée de (Helenius and Aebi 2001).

Selon la protéine des modifications supplémentaires, d'élagage et d'addition, se poursuivront dans l'appareil de Golgi au cours de son déplacement depuis la partie cis vers le réseau trans-Golgien. Ces modifications s'effectueront de façon séquentielle et ordonnée en suivant la spécificité de chaque enzyme pour chacun de ses sites d'action. La nature des arborisations finales permet de séparer les glycoprotéines matures en trois familles: le type riche en mannose, qui ne contient que des résidus mannose en plus de la structure de base; le type hybride qui contient différents sucres; et le type complexe qui ressemble au type hybride mais qui contient aussi des acides N-acétylneuraminiques (NANA aussi nommés acide sialiques) (Roth 2002, Dennis et al. 2002).

3.1.2 Mgat5

La *β 1-6N-acetylglucosaminyltransferaseV* ou GlcNAc-TV, dont le gène se nomme Mgat5 pour *mannoside acetyl glucosaminyl transférase 5*, est une des enzymes clé impliquées dans la formation des oligosaccharides de type complexe. Cette enzyme agit au niveau du compartiment médian de l'appareil de Golgi. Elle permet l'addition du branchement β 1-6GlcNAc sur le groupement hydroxyle du carbone 6 du résidu mannose de la séquence β 1,2Man α 1,6Man β 1 de l'oligosaccharide en cours de maturation. L'ajout de ce branchement β 1,6 va permettre la formation d'une troisième et d'une quatrième branche au niveau des arborisations de l'oligosaccharide (Figure 13). Ces branchements seront ensuite prolongés, dans le compartiment trans-Golgien, par une combinaison de groupements N-acetyllactosamine et poly-N-acetyllactosamine terminés par un

acide sialique, un fucose ou un sulfate (Cummings, Trowbridge et al. 1982; Shoreibah, Perng et al. 1993).

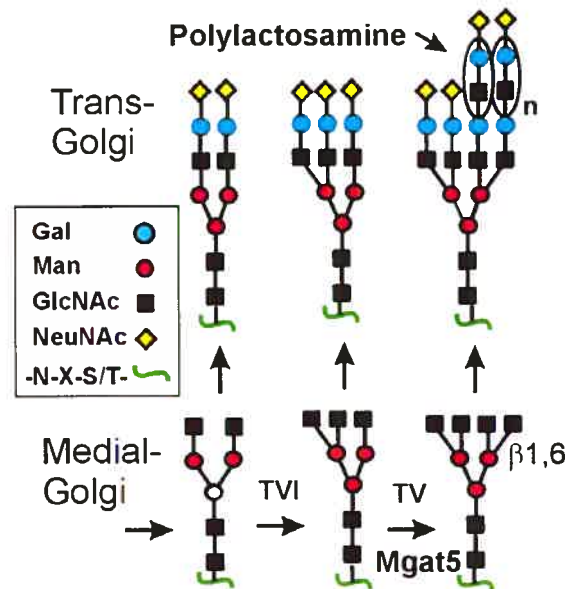


Figure 13: Représentation schématique des voies de maturation des N-glycans de type complexe, dans les compartiments médians et transgolgiens. L'activité de la β -N-acetylglucosaminyltransférase V, TV, dont le gène se nomme *Mgat5*, catalyse l'ajout d'un résidu GlcNAc sur le groupement hydroxyl du carbone 6 du résidu mannose de la séquence minimale acceptrice $\beta 1,2\text{Man}\alpha 1,6\text{Man}\beta 1$, qui constitue le branchement $\beta 1,6$ du N-glycan. Par l'ajout du branchement $\beta 1,6\text{GlcNAc}$, l'oligosaccharide acquiert un troisième et un quatrième branchement. Ces branchements seront prolongés par des groupements polylactosamines au cours de leur maturation. Le schéma est adapté de la figure parue dans l'article (Dennis, Pawling et al. 2002).

La maturation des N-glycans de type complexe est importante pour le développement des mammifères. En effet, la perte de l'expression du gène *Mgat1* est létale chez les souris au stade embryonnaire (Ioffe and Stanley 1994; Metzler, Gertz et al. 1994). La perte de l'expression des gènes *Mgat2* et *Mgat5*, qui codent pour des *GlcNAc-transférases* qui agissent à des stades plus tardifs que *Mgat1* dans la maturation golgienne, est viable mais entraîne de nombreux désordres spécifiques aux tissus (Granovsky, Fata et al. 2000; Wang, Tan et al. 2001).

3.2 Les galectines

La famille des galectines regroupe un ensemble de 14 protéines qui possèdent toutes un domaine de reconnaissance pour les carbohydrates (CRD) de 135 acides aminés ou domaine lectine avec beaucoup de similarité dans la séquence (Hughes 2001) (Figure 14). Les galectines se lient en général aux groupements Gal β 1,3GlcNac de type I ou au Gal β 1,4GlcNac de type II mais l'affinité la plus forte reste pour les chaînes de N-acetyllactosamine (Henrick, Bawumia et al. 1998; Barboni, Bawumia et al. 2000; Ochieng, Furtak et al. 2004); il s'agit donc d'un bon substrat pour les produits du gène *Mgat5*. La liaison des galectines avec les groupements carbohydrates est indépendante du calcium ce qui les différencie des lectines de type C comme la famille des sélectines (Perillo, Marcus et al. 1998). Les galectines agissent autant au niveau intracellulaire que extracellulaire (Hsu and Liu 2004; Ochieng, Furtak et al. 2004; Patterson, Wang et al. 2004; Zick, Eisenstein et al. 2004), ce sont des protéines cytoplasmiques qui, une fois sécrétées, peuvent se lier aux glycoprotéines et aux glycolipides à la surface

des cellules et à la MEC. Les galectines sont ainsi impliquées dans beaucoup de mécanismes incluant la croissance cellulaire, la différenciation, l'adhésion et l'apoptose (Ochieng, Leite-Browning et al. 1998; Perillo, Marcus et al. 1998; Hadari, Arbel-Goren et al. 2000; Matarrese, Fusco et al. 2000; Zick, Eisenstein et al. 2004). Toutes ces propriétés donnent aux galectines un rôle important dans la régulation du système immunitaire et inflammatoire (Almkvist and Karlsson 2004; Hirashima, Kashio et al. 2004; Pace and Baum 2004; Rabinovich, Toscano et al. 2004; Sato and Nieminen 2004), dans la progression du cancer (Van Den Brule, Califice et al. 2002; Bidon-Wagner and Le Pennec 2004; Grassadonia, Tinari et al. 2004; Takenaka, Fukumori et al. 2004) et dans certains processus spécifiques du développement (Hughes 2004; Watt, Jones et al. 2004).

L'obtention de souris *Knock-out* pour les galectines 1 et 3 a permis de démontrer que la perte de l'expression de ces galectines n'est pas critique pour le développement et la survie des souris (Colnot, Fowlis et al. 1998; Colnot, Ripoche et al. 1998). Ces délétions n'affectent pas la survie et la fertilité des animaux et les souris double mutants pour les galectines-1 et 3 sont viables (Colnot, Fowlis et al. 1998). Les premières études ont révélé que la perte de l'expression de la galectine-1 affecte le développement des neurones olfactifs et celui des muscles (Watt, Jones et al. 2004), et la perte de l'expression de la galectine-3 affecte le développement des os ainsi que la survie et l'activation des neutrophiles et des macrophages (Poirier 2002; Sano, Hsu et al. 2003).

3.2.1 Les structures et l'assemblage des galectines

Les galectines possèdent différentes structures, certaines sont composées d'un unique domaine CRD avec une courte séquence N-terminale (les galectines 1,

2, 5, 7, 10, 11, 13, 14) et d'autres de deux domaines CRD non-identiques rejoins par une courte séquence peptidique (les galectines 4, 6, 8, 9 et 12) (Bidon-Wagner and Le Pennec 2004; Leffler, Carlsson et al. 2004) (Figure 14). La galectine-3 possède la particularité d'être une protéine chimérique. Elle est formée de trois domaines différents, un petit domaine N-terminal de 12 acides aminés contenant des sites de phosphorylation pour la caséine kinase I (Huflejt, Turck et al. 1993), une séquence consensus répétée riche en résidus glycine, proline et tyrosine, sensible aux collagénases et un domaine CRD globulaire du côté C-terminal (Hughes 2001; Yang, Hsu et al. 2001) (Figure 15). Le domaine N-terminal est impliqué dans les mécanismes de sécrétion de la protéine et dans son ciblage vers le noyau (Gong, Honjo et al. 1999; Hughes 1999).

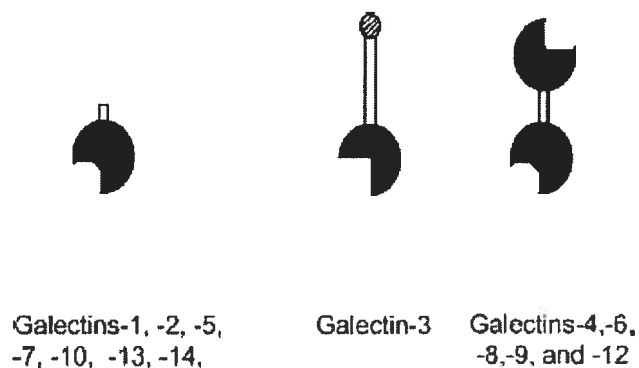


Figure 14: Les différents types de galectine. Le domaine CRD est représenté en noir. Schéma paru dans l'article (Leffler, Carlsson et al. 2004).

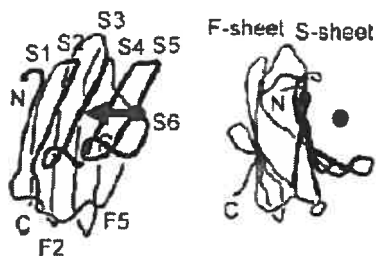


Figure 15: Représentation schématique du domaine CRD de la galectine-3. Le domaine CRD est formé de 135 acides aminés assemblés en conformation de sandwich beta. Les deux feuillets sont légèrement courbés avec 6 brins formant un bord concave (S1-S6) dessinés avec des lignes fines et 5 autres brins formant le bord convexe (F1-5). Le côté concave forme une niche dans laquelle le composé carbohydrate, illustré en rouge, vient se lier. Schéma paru dans l'article (Leffler, Carlsson et al. 2004).

Les galectines se présentent généralement sous la forme de dimères liés de façon non-covalente, toutefois cette conformation n'est pas toujours permise par la structure des galectines. La galectine-5 possède une queue N-terminale allongée de 13 acides aminés qui, en se repliant sur la molécule, empêche l'interaction entre les sous-unités et donc, la formation de dimère (Hughes 2001). La galectine-3, qui ne possède qu'un domaine CRD (Figure 15), peut se présenter sous la forme d'un monomère, d'un homodimère et d'un multimère. Cette association peut s'effectuer via son domaine NH₂ ou son domaine COOH-terminal (Yang, Hill et al. 1998). La liaison des galectines par leurs domaines N-terminaux permet la présentation de ses domaines CRD orientés de part et d'autre de la molécule et espacés d'environ 50Å pouvant ainsi faire un pont de plus de 120Å entre les glycoprotéines, une structure idéale pour permettre le pontage des protéines (Lobsanov, Gitt et al. 1993; Lobsanov, Gitt et al. 1993) (Figure 16). La galectine-3 se lie aux glycoprotéines avec une coopérativité positive dépendante du temps et de la concentration (Barboni, Bawumia et al. 1999). A plus forte concentration ou quand elle constitue un substrat, l'interaction entre ses domaines CRD-CRD et l'auto-association de ses queues N-terminales permettent la formation de complexes multivalents de lectines qui interagissent avec les groupements galactoside des glycoprotéines avec une plus haute affinité que les lectines monomériques (Birdsall, Feeney et al. 2001).

3.2.2 Les fonctions intracellulaires des galectines et leur mode de sécrétion

Les galectines sont synthétisées dans le cytosol, sans peptide signal de sécrétion (Menon and Hughes 1999). Depuis le cytosol, les galectines peuvent être

ciblées vers le noyau, un autre compartiment cytoplasmique ou être exportées vers le milieu extracellulaire. La plupart des galectines étudiées ont été localisées au niveau du noyau (Patterson, Wang et al. 2004). Dans le noyau, les galectines 1 et 3 s'associent à un complexe formé avec les ribonucléoprotéines et l'étude de cellules knock-out pour ces galectines a démontré qu'elles étaient impliquées dans les mécanismes d'épissage alternatif (Dagher, Wang et al. 1995; Vyakarnam, Lenneman et al. 1998). La galectine-3 interagirait également avec la molécule anti-apoptotique Bcl-2 dans le cytosol et les mitochondries (Akahani, Nangia-Makker et al. 1997).

Les galectines, tout comme l'AMF, sont des protéines cytoplasmiques sécrétées par une voie non classique car elles ne possèdent pas de peptide signal de sécrétion (Niinaka, Paku et al. 1998; Hughes 1999). La galectine-3 serait concentrée dans des évaginations de la membrane plasmique qui seraient ensuite libérées dans le milieu extracellulaire par un mécanisme impliquant la partie N-terminale de la protéine (Menon and Hughes 1999). Dans les cellules épithéliales, la sécrétion de la galectine-3 est polarisée, elle s'effectue du côté basolatéral des cellules et est régulée par la concentration extracellulaire de la galectine (Lindstedt, Apodaca et al. 1993; Bullock, Johnson et al. 2001).

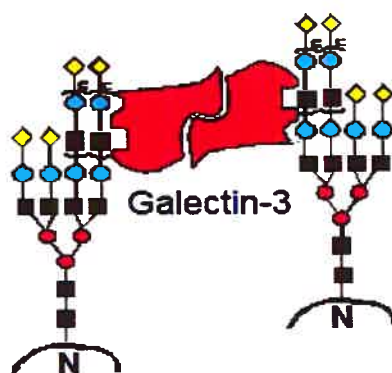


Figure 16: Représentation schématique du pontage de deux glycoprotéines par la liaison d'un homodimère de galectine-3, en rouge, au niveau des groupements polylactosamine des glycoprotéines. Ce schéma est adapté de la figure parue dans l'article (Dennis, Warren et al. 2001).

3.3 Les fonctions cellulaires de Mgat5 et des galectines

3.3.1 L'adhésion cellulaire

L'analyse structurale des sucres exprimés à la surface des glycoprotéines est loin d'être complète, toutefois, les produits du gène Mgat5 ont été identifiés à la surface de certaines protéines impliquées dans l'adhésion et la motilité des cellules. Ils sont présents à la surface des nombreuses protéines de la MEC (Dennis, Warren et al. 2001) et également au niveau de certaines intégrines comme LFA-1 ($\beta 2$) et $\alpha 5 \beta 1$ (le récepteur de la FN) (Asada, Furukawa et al. 1991; Nakagawa, Zheng et al. 1996). La transfection des cellules avec Mgat5 va non seulement augmenter l'expression des branchements β -1,6 au niveau des intégrines $\alpha 5$, αv et $\beta 1$, mais elle va également augmenter la motilité des cellules et diminuer leur adhésion sur un substrat (Demetriou, Nabi et al. 1995). Il a été proposé que la grande taille des produits du gène Mgat5 ainsi que la liaison des galectines au niveau de ces structures pourraient influencer la cinétique de liaison entre les protéines impliquées dans les mécanismes d'adhésion cellulaire (Granovsky, Fata et al. 2000).

La liaison des galectines au niveau des groupements polylactosamines des protéines exprimées à la surface des cellules et au niveau de la MEC va moduler l'adhésion cellulaire (Perillo, Marcus et al. 1998; Hughes 2001; Rabinovich, Toscano et al. 2004). Elles peuvent augmenter ou inhiber l'interaction des cellules avec la MEC selon les différentes conditions. Les galectines-3 et 8 ont été surnommées protéines matricellulaires pour leurs capacités à agir comme des molécules pro ou anti-adhésives (Hughes 2001; Levy, Arbel-Goren et al. 2001). Les galectines 3 et 8

sont probablement les deux galectines les plus étudiées et le mieux caractérisées, nous nous concentrerons sur ces deux protéines dans la suite de ce chapitre.

La galectine-8 peut réguler positivement ou négativement l'adhésion cellulaire dépendant du contexte extracellulaire (Figure 17) (Hadari, Arbel-Goren et al. 2000; Levy, Arbel-Goren et al. 2001). Quand elle est immobilisée dans la matrice, elle favorise l'adhésion, l'étalement et la migration des cellules, de la même manière que la FN (Levy, Arbel-Goren et al. 2001; Zick, Eisenstein et al. 2004). Elle stimule la phosphorylation de la protéine FAK et de la paxilline sans, par contre, induire la formation de points focaux d'adhésion. A l'inverse, lorsqu'elle est utilisée sous forme soluble, la galectine-8 interagit à la fois avec les intégrines de surface et les protéines de la MEC, et inhibe l'interaction de la cellule avec la matrice (Zick, Eisenstein et al. 2004). La galectine-8 se lie aux intégrines $\alpha 3$, $\alpha 6$, et $\beta 1$ par ses domaines CRD (Hadari, Arbel-Goren et al. 2000). Cependant, l'adhésion induite par la galectine-8 n'est pas totalement inhibée par le traitement des cellules avec l'EDTA, qui bloque les cations divalents indispensables à l'activité des intégrines, et elle est totalement insensible au traitement avec le peptide RGD (Zick, Eisenstein et al. 2004; Levy, Arbel-Goren et al. 2001) qui est couramment utilisé pour inhiber l'adhésion et la motilité cellulaire induite par les intégrines (Ruoslahti and Pierschbacher 1987). Par contre, l'effet inhibiteur de la galectine-8 est totalement bloqué par l'ajout d'ions manganèse, un puissant activateur des intégrines ce qui suggère que, dans ce cas précis, la liaison de la galectine-8 soluble pourrait stabiliser les intégrines dans un état de faible affinité (Hadari, Arbel-Goren et al. 2000).

La galectine-3 se lie à différentes protéines de la MEC: à la laminine (Woo, Shaw et al. 1990), la tenascine (Probstmeier, Montag et al. 1995) et à la FN (Ozeki, Matsui et al. 1995). Cette liaison peut s'effectuer directement ou via les intégrines. En solution, la galectine-3 s'associe avec l'intégrine $\alpha_1\beta_1$, le récepteur de la laminine et du collagène (Ochieng, Leite-Browning et al. 1998). La liaison de la galectine-3 avec l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ n'a pas été directement démontré, toutefois l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ porte des groupements polylactosamines (Nakagawa, Zheng et al. 1996), et la galectine-3 stimule l'internalisation de l'intégrine β_1 via une voie dépendante des cavéoles dans les cellules de carcinome du sein (Furtak, Hatcher et al. 2001). La galectine-3 se lie également à la molécule de surface CD98 (Dong and Hughes 1997) qui est impliquée dans le regroupement des intégrines à la surface des cellules (Fenczik, Sethi et al. 1997) et elle stimule l'expression des intégrines à la surface des cellules (Warfield, Makker et al. 1997; Matarrese, Fusco et al. 2000).

Selon les études et les types cellulaires, cette interaction va conduire à une augmentation ou à une inhibition de l'adhésion et de la motilité cellulaire. Dans le cas des cellules de carcinome du sein, différents laboratoires ont obtenu le même type de résultats que ceux obtenus avec la galectine-8 par le groupe du Dr Ronen (Zick, Eisenstein et al. 2004). La pré-incubation de ces cellules avec la galectine-3 soluble inhibe l'adhésion cellulaire (Ochieng, Leite-Browning et al. 1998) alors que l'augmentation de l'expression de la galectine-3 à la surface des cellules, par transfection, va augmenter l'adhésion des cellules et stimuler leur migration à travers une matrice de matrigel (Warfield, Makker et al. 1997; Matarrese, Fusco et al. 2000). De plus, la répression de l'expression de la galectine-3 par l'utilisation d'ARNm anti-sens affecte l'étalement et la croissance des tumeurs issues des cellules de

carcinome du sein ce qui confirme le rôle de la galectine-3 dans l'adhésion des cellules tumorales mammaires (Honjo, Nangia-Makker et al. 2001).

L'effet de la galectine-3 sur l'adhésion cellulaire peut aussi être modulé par sa concentration. Une faible concentration de la galectine-3, de l'ordre du $\mu\text{g/ml}$, stimule la migration des cellules tumorales mammaires à travers une matrice de matrigel (Le Marer and Hughes 1996) alors que cette stimulation sera inhibée par une plus forte concentration, probablement à cause de l'augmentation de l'adhésion de ces cellules au substrat (Matarrese, Fusco et al. 2000).

Il a été proposé que l'association des galectines avec les intégrines pourrait stabiliser l'association entre les cellules et entre les 2 sous-unités des intégrines et donc favoriser l'activation et l'agrégation des intégrines au niveau des contacts focaux d'adhésion, ou encore agir sur les voies de signalisation induites lors de l'activation des intégrines (Hughes 2001; Sato and Nieminen 2004) (Figure 16 et 18).

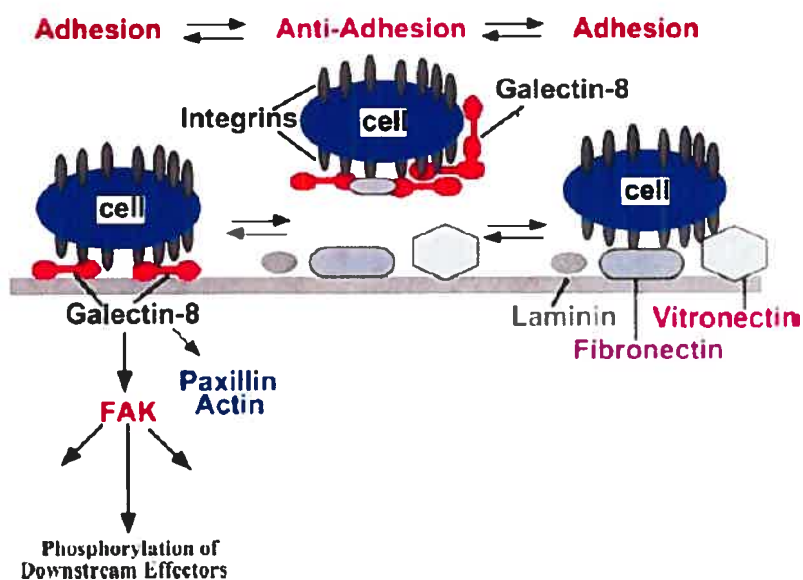


Figure 17: Les fonctions matricellulaires de la galectine-8. La galectine-8 immobilisée favorise l'adhésion et stimule la voie de signalisation des intégrines, alors que la galectine-8 soluble l'inhibe. Figure tirée de l'article (Zick, Eisenstein et al. 2004).

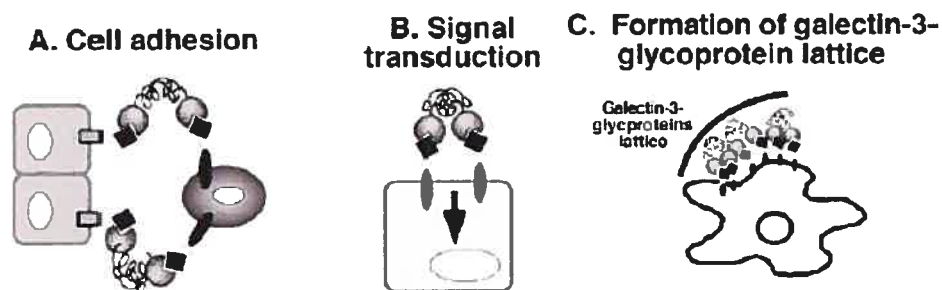


Figure 18: Le rôle de la galectine-3 dans l'adhésion. Schéma adapté de (Sato and Nieminen 2004)

L'action de la galectine sur l'adhésion cellulaire aura des effets sur la croissance et la survie des cellules. La transfection du gène de la galectine-8 inhibe la formation de colonies des cellules de carcinome de poumon (Hadari, Arbel-Goren et al. 2000). Le même effet a été observé en surexprimant la galectine-12 dans des cellules Hela (Yang, Hsu et al. 2001). L'effet inhibiteur pourrait donc s'effectuer via une action autocrine de la galectine sécrétée qui agirait au niveau des intégrines à la surface des cellules ou via une action intracellulaire des galectines qui n'a pas encore été démontrée (Zick, Eisenstein et al. 2004).

La perte de l'adhésion cellulaire est bien connue pour induire l'apoptose des cellules normales (Frisch and Francis 1994; Ruoslahti and Reed 1994). La galectine-8 provoque l'apoptose de différents types cellulaires toutefois son induction ne résulte pas de la perte d'adhésion car elle est induite alors que les cellules sont encore adhérentes (Hadari, Arbel-Goren et al. 2000). Ce qui suggère que l'effet anti-adhésif et l'effet apoptotique de la galectine-8 s'effectuent par deux voies différentes. A l'inverse, la galectine-3 protège les cellules contre l'apoptose induite par une variété de stimuli qui peuvent être cytotoxiques ou dépendre de la perte de l'adhésion cellulaire (Matarrese, Fusco et al. 2000).

3.3.2 Le système immunitaire et inflammatoire

Les galectines sont exprimées par différents types de cellules du système immunitaire: les cellules T, B, les macrophages, les éosinophiles et les basophiles. L'expression des galectines est modulée par différents stimuli inflammatoires suivant l'état d'activation de la cellule (Rabinovich, Toscano et al. 2004). Une même galectine peut avoir des effets pro ou anti-inflammatoires dépendants de multiples

facteurs comme sa concentration et le type de cellule cible testée. La galectine-1 agit en général comme un régulateur négatif de la réponse immunitaire: elle bloque la croissance des cellules, elle inhibe l'interaction des cellules T avec la MEC et elle induit l'apoptose des cellules T (Rabinovich, Toscano et al. 2004). A l'inverse, la galectine-3 semble être un régulateur positif de l'inflammation. Elle stimule l'adhésion des neutrophiles, empêche l'apoptose des cellule T et attire les leucocytes (Almkvist and Karlsson 2004). Des études effectuées chez des souris Knock-out pour la galectine-3 ont confirmé son action pro-inflammatoire (Colnot, Ripoche et al. 1998; Hsu, Yang et al. 2000).

L'expression des groupements $\beta 1,6\text{GlcNAc}$ des N-glycans est également très importante pour le fonctionnement du système immunitaire (Demetriou, Granovsky et al. 2001). L'étude des souris *Mgat5*^{-/-} a démontré qu'en fonction de l'âge les souris souffraient de glomérulonéphrite, une maladie auto-immune du rein (Demetriou, Granovsky et al. 2001). De plus, la réponse immunitaire des cellules T était exagérée dans les souris *Mgat5*^{-/-}, et les cellules T en culture étaient hypersensibles aux agonistes du récepteur des cellules T (TCR). Par contre, les cellules B *Mgat5*^{-/-} semblaient répondre normalement à une variété de stimuli, indiquant que ces anomalies étaient limitées à certains types cellulaires (Demetriou, Granovsky et al. 2001).

Les TCR sont recrutés au niveau des synapses immunitaires par le complexe peptide-complexe majeur d'histocompatibilité à la surface de la cellule présentatrice d'antigène. Un nombre minimum de récepteurs est requis au niveau de la synapse immunitaire pour permettre l'activation de la cellule (Reich, Boniface et al. 1997). Ce

nombre limite était augmenté dans les cellules *Mgat5*^{-/-}. Ce résultat suggérait que l'hypersensibilité des cellules T *Mgat5*^{-/-} était due à des changements au niveau des récepteurs à la surface des cellules (Demetriou, Granovsky et al. 2001). Les chaînes α et β du TCR portent 7 N-glycans (Hubbard, Kranz et al. 1986; Wang, Lim et al. 1998) et la glycosylation de ces peptides est importante pour leur assemblage en un complexe TCR mature. Le marquage positif des cellules T avec la lectine leucoagglutinine (L-PHA) (Dennis, Warren et al. 2001), qui lie spécifiquement les produits du gène *Mgat5* (Cummings and Kornfeld 1982), a confirmé que les peptides du TCR exprimaient bien les branchements β 1-6GlcNac qui portent les groupements poly-N-acetyllactosamine dans ces lignées cellulaires. Le groupe de James Dennis a démontré que la galectine-3 s'associait au récepteur (TCR) à la surface des cellules en se liant au niveau de ses branchements β 1-6 et que cette association permettait de réguler son activité (Dennis, Pawling et al. 2002). L'étude des cellules T issues de souris *Mgat5*^{-/-}, a montré que la perte de la liaison de la galectine-3 au niveau du TCR rendait les souris hypersensibles à différentes réponses immunitaires induites par les cellules T: l'activation du TCR avec un anticorps dirigé contre la sous-unité CD3 α était diminuée alors que l'agrégation du TCR et la susceptibilité des souris aux maladies auto-immunes était augmentée (Demetriou, Granovsky et al. 2001). Ceci suggère que, dans des conditions normales, la réponse du TCR à ses agonistes est modérée par la liaison de la galectine-3 qui limite probablement la mobilité et la signalisation de la cellule.

3.3.3 Le cancer

La transformation maligne des cellules est souvent accompagnée de l'expression de protéines possédant des oligosaccharides de type complexe avec de

larges arborisations (Buck, Glick et al. 1970). Des analyses ont démontré que ces arborisations provenaient de l'augmentation de l'expression des branchements β 1,6GlcNAc des N-glycans (Yamashita, Ohkura et al. 1984; Pierce and Arango 1986). Plus tard, le groupe de Dennis a confirmé que l'augmentation de l'expression des branchements β 1,6GlcNAc, due à l'augmentation de l'expression de la *N-acetylglucosaminyltransférase V*, était directement reliée au potentiel métastatique des cellules tumorales (Dennis, Laferte et al. 1987). Des études sur des tumeurs transplantables ont montré que l'expression de Mgat5 contribue directement à la croissance des tumeurs et à la progression des métastases chez les rongeurs. Les cellules tumorales mutantes qui n'expriment pas Mgat5 forment moins de tumeurs spontanées et les tumeurs grossissent moins vite que les cellules de type sauvage (Dennis, Laferte et al. 1987; Lu, Pelling et al. 1994). De plus, la perte de l'expression de Mgat5 dans les cellules épithéliales mammaires entraîne la perte de l'inhibition de la croissance des cellules par contact, l'augmentation de la motilité et la formation de tumeur chez les souris nues athymiques (Demetriou, Nabi et al. 1995) ainsi que l'augmentation de la formation des métastases (Seberger and Chaney 1999).

Chez l'humain, l'expression des produits du gène Mgat5 est augmentée dans un grand nombre de tumeurs. Dans les carcinomes de l'œsophage, ces structures sont retrouvées dans les régions du carcinome qui envahissent les tissus sains environnants (Takano, Nose et al. 1990). Une étude histologique effectuée sur des patients atteints de carcinomes colorectaux a montré que l'expression du branchement β 1-6 N-lié était associée à la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques avec un fort pronostic de récurrence et une diminution de la survie des patients atteints (Seelentag, Li et al. 1998). Toutefois, l'expression des

produits du gène *Mgat5* ne peut pas toujours être utilisée comme outil pronostic; les études sur les carcinomes du sein ayant montré des résultats contradictoires (Fernandes, Sagman et al. 1991; Chammas, Cella et al. 1994) et certains épithéliums normaux comme ceux du tractus gastro-intestinal expriment les branchements β 1-6 (Li and Roth 1997).

L'importance de l'expression des produits du gène *Mgat5* dans la progression tumorale a pu être confirmée avec l'obtention de souris PyMT déficientes pour le gène *Mgat5* (*Mgat5*^{-/-}) (Granovsky, Fata et al. 2000). Les souris *Mgat5*^{-/-} ont été générées par la mutation du gène cible dans des cellules souches embryonnaires puis ces souris *Mgat5*^{-/-} ont été croisées avec des souris exprimant l'oncogène viral PyMT. L'expression du transgène PyMT est associée avec la transformation et la formation de tumeurs multifocales dans les épithéliums mammaires (Guy, Cardiff et al. 1992; Bronson, Dawe et al. 1997; Webster, Hutchinson et al. 1998). La protéine PyMT est une protéine d'ancrage intracellulaire qui transforme les cellules en activant la voie de signalisation de l'oncogène ras, de la PI3-K et de la protéine kinase B (PKB, aussi nommée Akt) (Dilworth, Brewster et al. 1994) qui sont connues pour être activées dans les tumeurs humaines (Whitman, Kaplan et al. 1985; Dilworth, Brewster et al. 1994; Verbeek, Vroom et al. 1996; Liu, Testa et al. 1998).

L'utilisation de ces souris a permis de mieux comprendre l'importance de cette enzyme dans la progression du cancer. Ils ont observé que la croissance des tumeurs et des métastases induites par PyMT était considérablement diminuée dans les souris n'exprimant pas *Mgat5* comparativement aux souris de type sauvage (Granovsky, Fata et al. 2000). De plus, le turn-over des contacts focaux d'adhésion et l'état de phosphorylation de Akt sur le résidu serine 473 était aussi plus faible. Il a

donc été proposé que les N-glycans des récepteurs de surface, modifiés par Mgat5, pourraient collaborer avec PyMT intracellulaire pour activer Akt, et la croissance des tumeurs et des métastases (Granovsky, Fata et al. 2000).

L'activité des galectines augmente également avec la transformation maligne (Fernandes, Sagman et al. 1991; Takenaka, Fukumori et al. 2004). Elle serait impliquée dans différentes étapes de l'invasion et de la métastase via ses propriétés sur l'adhésion cellulaire ainsi que dans l'angiogenèse (Nangia-Makker, Honjo et al. 2000).

La sécrétion de la galectine-8 et son expression en surface sont fortement augmentées dans les carcinomes invasifs humains de la prostate et dans les néoplasies intra-épithéliales prostatiques mais pas dans les prostates normales ou dans les hypertrophies bénignes du tissu prostatique (Su, Lin et al. 1996). Pour ces raisons, elle a été renommée PCTA-1 pour antigène-1 tumoral du cancer de la prostate (Su, Lin et al. 1996). Un fort niveau de galectine-8 est également exprimé dans les carcinomes humains du poumon et dans les astrocytomes et les glioblastomes du système nerveux central (Bidon-Wagner and Le Pennec 2004).

L'expression de la galectine-3, quant à elle, est augmentée dans certains cancers et diminuée dans d'autres. L'expression de la galectine-3 est associée avec l'invasivité et le potentiel métastatique des cancers humains du colon, gastrique, de la thyroïde, de la tête et du cou (Van Den Brule, Califice et al. 2002; Takenaka, Fukumori et al. 2004). Dans la souris, le potentiel métastatique des mélanomes et des fibrosarcomes corrèle avec l'augmentation de l'expression de la galectine-3 en surface (Raz, Meromsky et al. 1987). Par contre, dans certains types de cancers, comme ceux du sein, des ovaires et de la prostate, l'expression de la galectine-3 est inversement corrélée avec le potentiel métastatique et, dans le cas du carcinome du

colon, les résultats des différentes études sont contradictoires (Van Den Brule, Califice et al. 2002; Takenaka, Fukumori et al. 2004). La perte de l'expression de la galectine-3 est parfois associée avec l'apparition de la galectine-1 comme c'est le cas pour des carcinomes de la prostate (Ellerhorst, Troncoso et al. 1999). Le fait que le niveau d'expression de la galectine-3 dépende du type d'organe et de tissu, suggère que des protéines spécifiques des tissus et des tumeurs doivent moduler l'expression de la galectine-3 (Takenaka, Fukumori et al. 2004).

Mac-2 BP est une grande glycoprotéine oligomérique composée de sous-unités de 90kDa qui fut tout d'abord identifiée comme étant le ligand de la galectine-3 puis celui des galectine-1 et 7 (Grassadonia, Tinari et al. 2004). Elle a été identifiée comme étant identique à un antigène sécrété par les cellules du cancer du sein chez l'humain nommée 90K (Iacobelli, Arno et al. 1986) souvent identifié dans les pronostics de faible chance de survie (Iacobelli, Sismondi et al. 1994; Zeimet, Natoli et al. 1996). L'interaction des galectine-1 et 3 avec la protéine 90K favoriserait la formation d'agrégats multicellulaires et l'adhésion des cellules à la MEC (Grassadonia, Tinari et al. 2004) ce qui pourrait favoriser l'établissement de nouvelles colonies.

Les galectines sont également impliquées dans l'angiogenèse. La galectine-3 stimule, *in vitro*, la formation des tubes de capillaires par les cellules HUVEC et *in vivo*, la néo-vascularisation des vaisseaux (Sanford and Harris-Hooker 1990; Nangia-Makker, Honjo et al. 2000). De son côté, la galectine-1 a un effet mitogénique sur les cellules vasculaires endothéliales et sur les cellules du muscle lisse (Moiseeva, Javed et al. 2000).

Les métalloprotéases sont des protéines très importantes, impliquées dans la dissémination des cellules métastatiques (Klein, Vellenga et al. 2004). La galectine-3 est le substrat des métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 (Ochieng, Fridman et al. 1994). La coupure induite par ces métalloprotéines génère un peptide de 22 KDa contenant le domaine CRD et un peptide de 9KDa qui comprend la région N-terminale de la galectine (Herrmann, Turck et al. 1993; Ochieng, Fridman et al. 1994). La fonction biologique de ces peptides est inconnue. Ils pourraient avoir un rôle durant la métastase lorsque l'expression de MMP2 rend les tumeurs plus agressives, toutefois des études ont montré qu'ils agissaient comme des formes dominantes négatives de la galectine-3 car ils possèdent une très forte affinité pour les conjugués glycosylés et leurs liaisons inhibent la plupart des activités de la galectine-3 (Sato and Nieminen 2004).

ARTICLES

ARTICLE 1**Expression of autocrine motility
factor/phosphohexose isomerase in Cos7 cells**

Annick Lagana, Thomas Duchaine, Avraham Raz, Luc DesGroseillers, and Ivan R.
Nabi

Biochemical and Biophysical Research Communications
Volume 273, Issue 1 , 24 June 2000, Pages 213-218.

CONTRIBUTION DES AUTEURS

J'ai effectué toutes les expériences qui sont présentées dans cet article et j'ai participé à la rédaction de l'article.

Thomas Duchaine m'a appris les techniques de biologie moléculaires qui m'ont permise de fabriquer la protéine de fusion AMF/PGI-HA dans le laboratoire et sous la direction du **Dr Luc DesGroseillers**.

Mon directeur de recherche, **Le Dr Ivan R. Nabi**, m'a aidé tout au long de ce projet de recherche et a participé à la rédaction de l'article.

Expression of autocrine motility factor/phosphohexose isomerase in Cos7 cells

Annick Lagana[†], Thomas Duchaine[‡], Avraham Raz*, Luc DesGroseillers[‡], and Ivan R. Nabi[†]

Departments of Pathology and Cell Biology[†] and Biochemistry[‡], Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7 and *Karmanos Cancer Institute, Detroit, Michigan 48201, U.S.A.

Key words: AMF, glucose-6-phosphate isomerase, glycolysis, pseudopodia, cell motility

Short title: AMF/PHI in Cos7 cells

Corresponding author:

Dr. Ivan R. Nabi

Tel.: (514) 343-6291

Département de pathologie et biologie cellulaire

Fax: (514) 343-2459

Université de Montréal

C. P. 6128, succursale A

Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Courier address:

Département de pathologie et biologie cellulaire

Université de Montréal, Pavillon principal N-812

2900 Blvd. Edouard Montpetit

Montréal, Québec, Canada H3T 1J4

ABSTRACT

Autocrine motility factor (AMF) is identical to the glycolytic enzyme phosphohexose isomerase (PHI) and overexpression of AMF/PHI is associated with tumor malignancy. In order to study the overexpression of AMF/PHI, an HA-tagged AMF construct was transiently transfected into Cos7 cells. Expression of a tagged AMF-HA allowed us to determine that over a period of 16 hours only a small amount (0.1-1%) of total cellular AMF-HA was secreted into the cell medium. Cell-associated AMF-HA was exclusively cytosolic as it could be completely extracted with Triton X-100 and concentrated within actin rich pseudopodial domains. Treatment of the cells with the glycolysis inhibitor oxamate disrupted the association of AMF-HA with actin concentrations demonstrating that glycolysis regulates the formation of these AMF/PHI-associated actin-rich protrusions. AMF/PHI is a well-characterized tumor cell secreted cytokine and we identify here an alternate intracellular function for this glycolytic enzyme/cytokine in cell motility.

INTRODUCTION

The cytosolic glycolytic enzyme, phosphohexose isomerase (PHI), is identical to the tumor cell secreted cytokine autocrine motility factor (AMF) (1), to neuroleukin (NLK), a neurotrophic factor for spinal and sensory neurons and a lymphokine (2, 3), and to maturation factor (MF), which mediates the differentiation of human myeloid leukemic cells to terminal monocytic cells (4). The cDNA sequences of AMF, NLK, and MF found in both human cancer and normal cells were found to be identical to that of PHI suggesting that under select cellular conditions PHI is secreted into the extracellular milieu (1, 2, 3, 4, 5). AMF purified from tumor cell conditioned medium exhibits isomerase activity and PHI purified from rabbit muscle stimulates cell motility and binds to the AMF receptor, AMF-R, demonstrating that the same protein exhibits two distinct functions (1, 6). PHI is therefore a cytosolic enzyme that catalyzes the reversible isomerization of D-glucose-6-phosphate to D-fructose-6-phosphate, an essential reaction in glycolysis and gluconeogenesis, and that upon secretion acts as a cytokine variously referred to as AMF, NLK or MF.

Increased expression of AMF/PHI in the urine and serum of patients is associated with malignant colorectal, breast, lung, kidney and gastrointestinal carcinomas (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13). However, exogenous introduction of high levels of AMF/PHI into cells has yet to be performed. Here, we transfected Cos7 cells with a fusion protein of AMF containing a C-terminal hemagglutinin epitope tag, AMF-HA, cloned into the high copy pCDNA3-RSV expression vector in order to study the overexpression of AMF-HA. Transiently transfected AMF-HA is localized to the cytosol of Cos7 cells where it concentrates within actin-rich protrusive domains in a glycolysis-dependent manner. Interaction between actin and glycolytic enzymes is therefore proposed to provide an immediate and localized energy supply for actin filament assembly which drives pseudopod formation. Our data therefore

demonstrate that the function of AMF/PHI in cell motility is not limited to its activity as a secreted cytokine.

MATERIAL AND METHODS

Antibodies and reagents

Immunopurified monoclonal antibody to the 10 amino acid hemagglutinin tag (HA) kindly provided by Michel Bouvier (Department of Biochemistry, Université de Montréal). Secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Texas Red conjugated phalloidin and Alexa 488 conjugated goat anti-mouse secondary antibody were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Oxamate, pyruvate, trypsin-chymotrypsin inhibitor, luminol, PMSF, p-nitrophenyl p'-guanidino benzoate, leupeptin, pepstatin A, aprotinin, and sodium butyrate were purchased from Sigma.

Preparation of AMF-HA cDNA

The human nucleotide sequence of AMF cDNA (5) (GenBank accession no. KO3515) inserted at the EcoRI site of the pBK-CMV phagemid was amplified by PCR with Vent DNA polymerase (New England BioLabs), using as primers 5'-ATCAAGCTTTCCGCCATGGCCGCTCTCAC-3', corresponding to the 5' sequence of AMF and including a Hind III site upstream of the start codon, and 5'-GATTCTAGATTAGCGGCCGCTTTGGACTCTGGCCTCGCGCTG-3', corresponding to the 3' sequence of AMF and including a Not I site upstream and a Xba I site downstream of the stop codon. The resulting PCR fragment was cloned into EcoR I site of pBluescript (Stratagen) by blunt end cloning, then excised by digestion with Hind III and Xba I, and the resulting fragment subcloned into the pCDNA3/RSV vector (14) provided by Michel Bouvier (Department of Biochemistry, Université de

Montréal). The Not I restriction enzyme site permitted the introduction of a Not I cassette containing three copies of the HA tag (Pierre Belhumeur, Department of Microbiology and Immunology, Université de Montréal) at the 3' extremity of the AMF cDNA.

Cell Culture, transfection and drug treatments

Cos7 cells were cultured in Dulbecco minimum essential medium containing 25 mM NaHCO₃ (DMEM-NaHCO₃), 10% fetal calf serum, glutamine, essential amino acids, vitamins, penicillin and streptomycin (Gibco; Burlington, Ontario, Canada) under 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Transient transfection of Cos7 cells was performed with lipofectin (Gibco BRL). Cells were plated sparsely on glass coverslip for 1 day, and then incubated in lipofectin mixed with 5 µg/ml AMF-HA cDNA or pCDNA3/RSV vector in serum free medium for 6 hours, then incubated in regular medium for 24 hours. Oxamate and pyruvate were added at a concentration of 100 mM directly to the cell culture medium for 1 hour. To prepare conditioned medium, cells were incubated in medium supplemented with 1 µg/ml BSA, 10 µg/ml aprotinin, 2 mM butyrate, 100 µg/ml trypsin-chymotrypsin inhibitor for 16 hours.

Cell lysates, conditioned medium and western blots

To prepare cell lysates, cell monolayers were washed three times with ice-cold PBS/CM and harvested by scraping. Cell pellets were resuspended in 100 µl of lysis buffer consisting of PBS containing 1% SDS, 1 mM EDTA and protease inhibitors (1 mM PMSF, 0.05 mM p-nitrophenyl p'-guanidino benzoate, 10 µg/ml leupeptin, pepstatin A and aprotinin). Cells were lysed for 20 min on ice and then DNA was broken by sonication. The cell lysates were centrifuged at 15,000 rpm for 5 minutes

and the supernatant recovered and assayed for protein concentration using the BCA protein assay (Pierce, Rockford, Illinois). 20 µg of protein were analyzed by SDS-PAGE.

To analyze secreted proteins, conditioned medium was centrifuged at 3000 rpm and filtered with a 0.2 µm filter to eliminate detached and dead cells. Proteins were precipitated with 4 volumes of precooled (-20°C) acetone, placed for 1 hour at -80°C, and then pelleted by centrifugation at 6,000 rpm for 20 min. The pellet was resuspended to 300 µl with sample buffer. Total cell lysates were prepared from the same dishes from which conditioned medium was collected and the cell pellet resuspended in an equivalent 300 µl volume of sample buffer. For the lanes labeled 1:1, 25 µg of protein in the cell lysate and an equivalent volume of the conditioned medium sample were loaded for SDS-PAGE. For the lanes labeled 1:10, 1:100 and 1:1000, each well was loaded with 2.5, 0.25, and 0.025 µg protein of the cell lysate, respectively.

Samples were separated on 9% SDS-PAGE gels and blotted to nitrocellulose membranes using a Mini-Protean apparatus (BioRad Labs, Mississauga, ON). The blot was blocked with 5% skim milk in PBS/CM, incubated with anti-HA primary antibody and then with the appropriate secondary conjugated to horseradish peroxidase. The labeled bands were revealed by chemiluminescence using preflashed Kodak X-Omat film. Prestained Kaleidoscope molecular weight markers were purchased from BioRad.

Indirect immunofluorescence.

Cells were fixed with 3% paraformaldehyde for 15 min at room temperature, rinsed extensively with PBS (pH 7.4) supplemented with 0.1 mM Ca^{++} and 1 mM Mg^{++} (PBS/CM), permeabilized with 0.2 % Triton X-100 in PBS/CM for 10 min, and

then incubated for 30 min with PBS/CM containing 0.5% BSA (PBS/CM/BSA) to reduce nonspecific binding. Where indicated, cells were extracted with 0.2% Triton X-100 in PBS/CM for 1 min before fixation (15). All washings and incubations with both primary and secondary antibodies were done with PBS/CM/BSA. AMF-HA was revealed by incubation with mouse anti-HA monoclonal antibody for 30 min followed by Alexa 488 coupled anti-mouse antibody for 30 min. Actin was labelled by incubation with Texas Red phalloidin for 30 min. After labeling, the coverslips were mounted in Airvol (Air Products and Chemicals, Allentown, PA) and viewed in a Zeiss Axioskop fluorescent microscope equipped with a 63 X Plan Apochromat objective and selective filters. Images were photographed using Kodak T-Max 400 film. Confocal microscopy was performed with the 60X Nikon plan Apochromat objective of a dual-channel Bio-Rad 600 laser scanning confocal microscope equipped with a krypton-argon laser and the appropriate dichroic reflectors to distinguish Alexa 488 and Texas Red labeling. The number of colocalizations between actin and AMF-HA concentrations were counted per transfected cell from double labeled merged confocal images.

RESULTS

Cos7 cells transiently transfected with a cDNA coding for the AMF-HA fusion protein were analyzed by western blot using the anti-HA monoclonal antibody (Figure 1 A). As controls, untransfected cells and cells transfected with vector alone or with untagged AMF were also analyzed. In the cell lysates, the anti-HA antibody recognized two bands of ~120 and 80 kD in a non-specific fashion however a specific band of 56 kD was observed under reducing conditions only in AMF-HA transfected Cos7 cells corresponding to the established molecular weight of the protein. Under non-reducing conditions, two specific bands were observed at 64 and 130 kD correspond to the monomeric non-denatured and dimeric forms of AMF-HA respectively (Figure 1 A). The migration of AMF-HA at 56 kD under reducing conditions and at 64 kD under non-reducing condition has been previously reported for AMF (1, 16) and together with the presence of a 130 kD form under non-reducing conditions corresponding to the glycolytically active dimer form of the enzyme, these data indicate that the C-terminal HA tag has not affected the proper folding of the protein. In concentrated conditioned medium prepared from AMF-HA transfected Cos7 cells, the anti-HA antibody recognized a band that migrated slightly below the AMF-HA found in cell lysates (Figure 1 B). The protein precipitate of conditioned medium and the cell pellet obtained from the same culture dish were resuspended in the same volume of sample buffer in order to determine quantitatively the amount of AMF-HA that was secreted relative to cell expressed AMF-HA. The intensity of the AMF-HA band was less than that of a sample of the cell lysate diluted 100X but greater than that of a sample diluted 1000X indicating that small quantities of AMF-HA equivalent to 0.1-1% of total cellular AMF-HA are secreted over a 16 hour period (Figure 1 B).

By immunofluorescence, AMF-HA is diffusely localized within the cytoplasm of Cos7 cells and there is a marked accumulation of AMF-HA in F-actin rich sites

(Figure 2 A, B). Untransfected cells are not labeled indicating that the non-specific binding of the anti-HA antibody by western blot is not detected by immunofluorescence and that the labeling is specific. Incubation of cells with 0.2% Triton-X100 prior to fixation resulted in the complete extraction of the labeling demonstrating the cytosolic distribution of AMF-HA (Figure 2 C). The phalloidin labeled actin cytoskeleton was not completely extracted reflecting a weak association between AMF-HA and actin.

By confocal microscopy, the clear colocalization of AMF-HA with actin concentrations at cellular protrusions can be seen (Figure 3 A, B, C). PHI is a glycolytic enzyme that catalyzes the reversible isomerisation of D-glucose-6-phosphate to D-fructose-6-phosphate. In order to determine whether the glycolytic activity of PHI regulates its association with actin-rich protrusive domains, we treated the cells for one hour with 100 mM oxamate, an inhibitor of anaerobic glycolysis which blocks the activity of lactate dehydrogenase (17, 18). Treatment with oxamate results in the clear disruption of AMF-HA accumulation in actin-rich domains and a diffuse labeling of AMF-HA throughout the cell (Figure 3 D, E, F). Treatment of the cells with oxamate in the presence of an equivalent concentration of pyruvate, the natural substrate for lactic dehydrogenase, restored the colocalization of AMF-HA concentrations with actin-rich domains (Figure 3 G, H, I). Essentially all actin-rich domains exhibited a concentration of AMF-HA. Quantification of the number of actin-rich domains per cell to which AMF-HA was concentrated revealed that untreated cells or cells treated with oxamate in the presence of pyruvate contained 7-8 actin rich domains per AMF-HA expressing cell and that (Figure 4). Oxamate treated cells exhibited only 1-2 actin-rich domains to which AMF-HA was concentrated demonstrated that active glycolysis regulates the formation of actin-rich protrusions.

DISCUSSION

Epitope tagged AMF/PHI is shown here to associate with actin-rich domains of transiently transfected Cos7 cells. The addition of the HA tag to the AMF/PHI C-terminal domain did not perturb PHI folding because the dimeric form of AMF-HA was detected in non-reducing SDS-PAGE (Figure 1 A). Furthermore, the association of AMF-HA with actin-rich cellular protrusions as well as the ability of an inhibitor of glycolysis to alter the cellular distribution of AMF-HA further indicates that the transfected enzyme has retained its glycolysis-related activity (Figures 3 and 4). Increased expression of AMF in tumor cells is associated with its secretion and function as an extracellular cytokine (19). Small quantities of AMF-HA, equivalent to 0.1-1% of total cellular AMF-HA, were released into the conditioned medium of AMF-HA transfected Cos7 cells over a period of 16 hours (Figure 1 B). AMF-HA was not detected in the conditioned medium of untransfected cells and the conditioned medium was centrifuged and filtered to eliminate any contribution from dissociated cells. The minimal levels of secreted AMF-HA that we have detected may correspond to cytokine levels released normally by AMF/PHI secreting cells such that the amount of cytokine released represents only a minor fraction of cellular expression of this cytosolic glycolytic enzyme. Due to the minimal amounts of AMF-HA secreted it is possible that the AMF-HA detected was released from dead or lysed cells and that Cos7 cells do not actively secrete AMF/PHI. However, the fact that secreted AMF-HA migrated slightly faster than cell associated AMF-HA suggests that it may have undergone post-translational modification and was therefore specifically secreted by the cells. AMF/PHI is phosphorylated by casein kinase II in HT-1080 cells and it has been proposed that AMF/PHI phosphorylation may regulate its secretion (20). Whether the amount of AMF-HA secreted relative to

total cellular expression by metastatic tumor cells is equivalent to the minimal levels secreted by Cos7 cells remains to be determined.

Glycolytic enzymes have long been described to associate with the actin cytoskeleton enabling the compartmentalization of these energy-generating enzymes to select cytosolic locations (21). Specific binding of glycolytic enzymes to actin *in vitro* has been described (22, 23, 24). *In vivo*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase has been shown to be associated with F-actin in synaptosomes and at post-synaptic sites (25). In very confluent cultures of epithelial MDCK cells, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was Triton X-100 insoluble and exhibited ATP-dependent cytoskeleton association (26). Glycolytic activity correlates with cell-cycle associated changes in the F-actin cytoskeleton suggesting that glycolytic activity may regulate actin cytoskeleton organization (27). Aldolase exists in equilibrium between a soluble and actin associated form; the ability to disrupt interaction with the actin cytoskeleton with the glycolysis inhibitor, 2-deoxyglucose, demonstrates that glycolytic activity can regulate the association of glycolytic enzymes with the actin cytoskeleton (28, 29). In Cos7 cells, the association of AMF-HA with actin-rich domains is completely detergent extractable (Figure 2) reflecting its weak cytoskeletal association, as described previously for other glycolytic enzymes (30). In the presence of the glycolytic inhibitor oxamate, AMF-HA exhibits a more diffuse distribution than in untreated cells (Figure 3 D, E, F) and exhibits a significantly reduced association with actin densities (Figure 4). Due to the disruptive effect of glycolysis inhibition on the expression of actin-rich pseudopodia shown here in Cos7 cells, as described previously in an invasive epithelial-derived cell line (31), it is not clear whether inhibition of glycolysis in these cells affects the formation of actin-rich pseudopodia or specifically the association of AMF/PHI with these cellular domains. Nevertheless, glycolysis is shown to be required for the formation of protrusive cellular domains rich in both actin and the glycolytic enzyme PHI.

AMF/PHI specifically associates with peripheral actin-rich protrusions corresponding to the lamellipodia or pseudopodia of a motile cell. Localized actin polymerization drives the protrusion of motility-associated cellular structures and pseudopodial protrusion is a critical element of cell movement (32, 33, 34, 35, 36). For the tumor cell, upregulation of multiple glycolytic enzymes is associated with tumor malignancy (37, 38) and glycolysis is the principal supply of energy for cell motility (39). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase has recently been localized to the actin-rich pseudopodia of an invasive variant of Moloney sarcoma transformed MDCK cells and glycolysis shown to regulate the protrusion of the multiple pseudopodia, and thereby the motility, of those cells (31). The localization of AMF/PHI to actin rich domains therefore identifies another glycolytic enzyme that is associated with actin-rich pseudopodia and suggests that multiple glycolytic enzymes should be expected to be associated with motile actin-rich pseudopodial domains. The reduction of actin densities in oxamate treated Cos7 cells observed here further supports a role for glycolysis in pseudopodial protrusion in cell motility. Formation of a localized glycolytic cytomatrix at the site of pseudopodial protrusion is therefore involved in active actin-mediated pseudopodial protrusion. Increased expression of AMF/PHI in tumor cells may act to enhance tumor malignancy in two ways: 1) by enhancing glycolytic activity and stimulating pseudopodial activity; and 2) via its secretion and activity as an extracellular motility stimulating cytokine.

REFERENCES

1. Watanabe, H., Takehana, K., Date, M., Shinozaki, T. and Raz, A. (1996) *Cancer Res.* 56, 2960-2963
2. Chaput, M., Claes, V., Portetelle, D., Cludts, I., Cravador, A., Burny, A., Gras, H. and Tartar, A. (1988) *Nature (Lond.)* 332, 454-457
3. Faik, P., Walker, J. I. H., Redmill, A. A. M. and Morgan, M. J. (1988) *Nature (Lond.)* 332, 455-457
4. Xu, W., Seiter, K., Feldman, E., Ahmed, T. and Chiao, J. W. (1996) *Blood* 87, 4502-4506
5. Niinaka, Y., Paku, S., Haga, A., Watanabe, H. and Raz, A. (1998) *Cancer Res.* 58, 2667-2674
6. Benlimame, N., Le, P. U. and Nabi, I. R. (1998) *Molec. Biol. Cell* 9, 1773-1786
7. Bodansky, O. (1954) *Cancer* 7, 1200-1226
8. Schwartz, M. K. (1973) *Clin. Chem.* 19, 10-22
9. Baumann, M. and Brand, K. (1990) *Cancer Res.* 48, 7018-7021
10. Baumann, M., Kappel, A., Brand, K., Siegfeld, W. and Paterok, E. (1990) *Cancer Invest.* 8, 3510356
11. Guirguis, R., Javadpour, N., Sharareh, S., Biswas, C., el-Amin, W., Mansur, I. and Kim, J. S. (1990) *J. Occup. Med.* 32, 846-853
12. Filella, X., Molina, R., Jo, J., Mas, E. and Ballesta, A. M. (1991) *Tumor Biology* 12, 360-367
13. Patel, P. S., Rawal, G. N., Rawal, R. M., Patel, G. H., Balar, D. B., Shah, P. M. and Patel, D. C. (1995) *Neoplasia* 42, 271-274
14. Jockers, R., Da Silva, A., Strosberg, A. D., Bouvier, M. and Marullo, S. (1996) *J Biol Chem* 271, 9355-9362
15. Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I. R. and DesGroseillers, L. (1999) *Molec. Biol. Cell* 19, 2220-2230

16. Liotta, L. A., Mandler, R., Murano, G., Katz, D. A., Gordon, R. K., Chiang, P. K. and Schiffman, E. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 3302-3306
17. Elwood, J. C. (1968) *Cancer Res* 28, 2056-2060
18. Goldberg, E. B. and Colowick, S. P. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 2786-2790
19. Silletti, S. and Raz, A. (1996) *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 213/II, 137-169
20. Haga, A., Niinaka, Y. and Raz, A. (2000) *Biochimica Biophysica Acta* 36155, 1-10
21. Masters, C. (1984) *J. Cell Biol.* 99, 222s-225s
22. Lanzara, V. and Grazi, E. (1987) *FEBS Lett.* 221, 387-390
23. Méjean, C., Pons, F., Benyamin, Y. and Roustan, C. (1989) *Biochem. J.* 264, 671-677
24. Wang, J., Morris, A. J., Tolan, D. R. and Pagliaro, L. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 6861-6865
25. Rogalski-Wilk, A. A. and Cohen, R. S. (1997) *Cell. Mol. Neurobiol.* 17, 51-70
26. Cao, F., Yanagihara, N. and Burke, J. M. (1999) *Cell Motil Cytoskeleton* 44, 133-142
27. Bereiter-Hahn, J., Stubig, C. and Heymann, V. (1995) *Exp. Cell Res.* 218, 551-560
28. Pagliaro, L. and Taylor, D. L. (1988) *J. Cell Biol.* 107, 981-991
29. Pagliaro, L. and Taylor, D. L. (1992) *J. Cell Biol.* 118, 859-863
30. Knull, H. R. and Walsh, J. L. (1992) *Curr Top Cell Regul* 33, 15-30
31. Nguyen, T. N., Wang, H.-J., Zalzal, S., Nanci, A. and Nabi, I. R. (2000) *Exp. Cell Res.* In press,
32. Stossel, T. P. (1993) *Science* 260, 1086-1094
33. Condeelis, J. (1993) *Ann. Rev. Cell Biol.* 9, 411-444
34. Mitchison, T. J. and Cramer, L. P. (1996) *Cell* 84, 371-379
35. Lauffenberger, D. A. and Horwitz, A. F. (1996) *Cell* 84, 359-369
36. Nabi, I. R. (1999) *J. Cell Sci.* 112, 1803-1811

37. Weber, G. (1977) N. Engl. J. Med. 296, 541-551
38. Warburg, O. (1956) Science 123, 309-314
39. Beckner, M. E., Stracke, M. L., Liotta, L. A. and Schiffmanm, E. (1990) J. Natl. Cancer Inst. 82, 1836-1840

FIGURE LEGENDS

Figure 1. AMF-HA expression of transiently transfected Cos7 cells. A. Cell lysates of untransfected Cos7 cells (Untfd), or Cos7 cells transfected with empty pCDNA3/RSV vector (E vector), pCDNA3/RSV vector containing AMF cDNA (AMF) or pCDNA3/RSV vector containing AMF-HA cDNA (AMF-HA), were loaded under reducing and non-reducing conditions, as indicated, on SDS-polyacrylamide gels and immunoblotted with antibody to HA. Specific bands corresponding to AMF-HA migrated at 56 Kd under reducing conditions and at 64 Kd and 130Kd, corresponding to the monomeric and dimeric forms of AMF-HA, respectively, under non-reducing conditions. Molecular weight markers are indicated on the lefthand side of the gels and calculated molecular sizes of AMF-HA under non-reducing conditions are indicated with arrowheads on the righthand side of the gels. B. Conditioned medium (Cond. Med.) was prepared from untransfected (Untfd) and AMF-HA transfected Cos7 cells as described in the Materials and Methods. From the same plate, a cell lysate was prepared in an equivalent volume of sample buffer. Undiluted (1:1) samples of the cell lysate and conditioned medium and diluted samples (1:10, 1:100, and 1:1000 as indicated) of the AMF-HA cell lysate were loaded under reducing conditions on SDS-polyacrylamide gels and immunoblotted with antibody to HA. Migration of the 56 kD AMF-HA in cell lysates is indicated by the arrowhead.

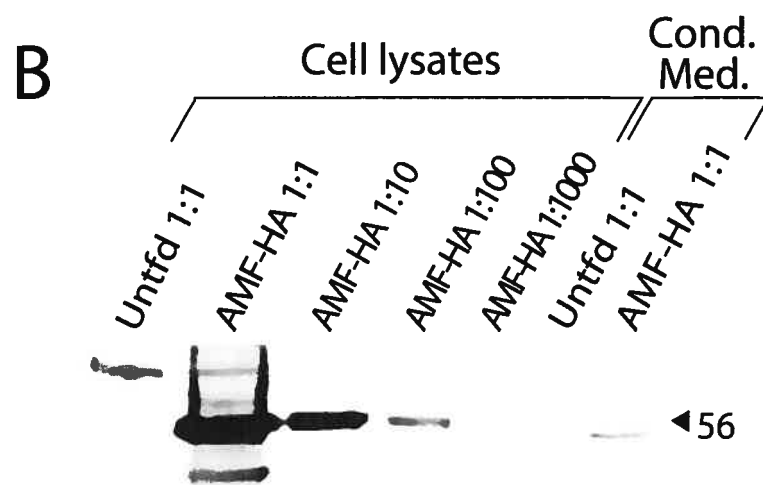
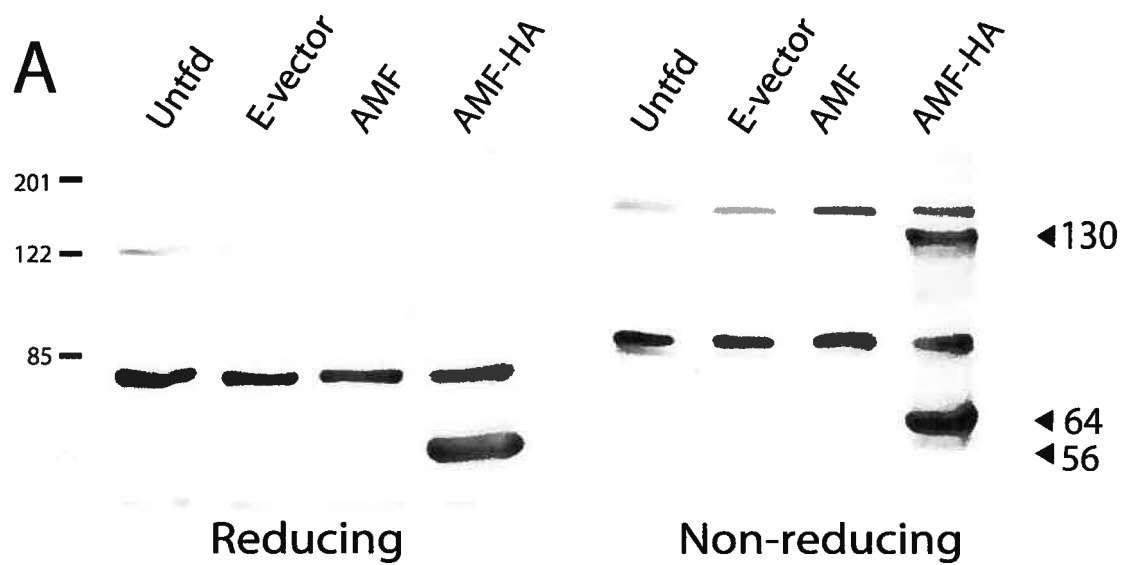


FIGURE LEGENDS

Figure 1: PGI/AMF binding to cell surface fibrils requires FN expression. FN^{+/+} (A-C, G-I) and FN^{-/-} (D-F, J-L) fibroblasts were plated for 2 days on glass cover slips. The cells were incubated with 25 µg/ml PGI/AMF conjugated to Alexa-568 (PGI/AMF-568) for 30 minutes at 37°C in medium buffered to pH 7.5 with Hepes (A-F) or to pH 5.0 with MES (G-L) and then fixed with 3% paraformaldehyde. PGI/AMF-568 labeling is shown in red (A, D, G, J) and FN labelled with mouse anti-FN mAb and Alexa-488 conjugated anti-mouse secondary antibody shown in green (B, E, H, K). Merged images show colocalization of the two in yellow (C, F, I, L). Bar: 10 µm.

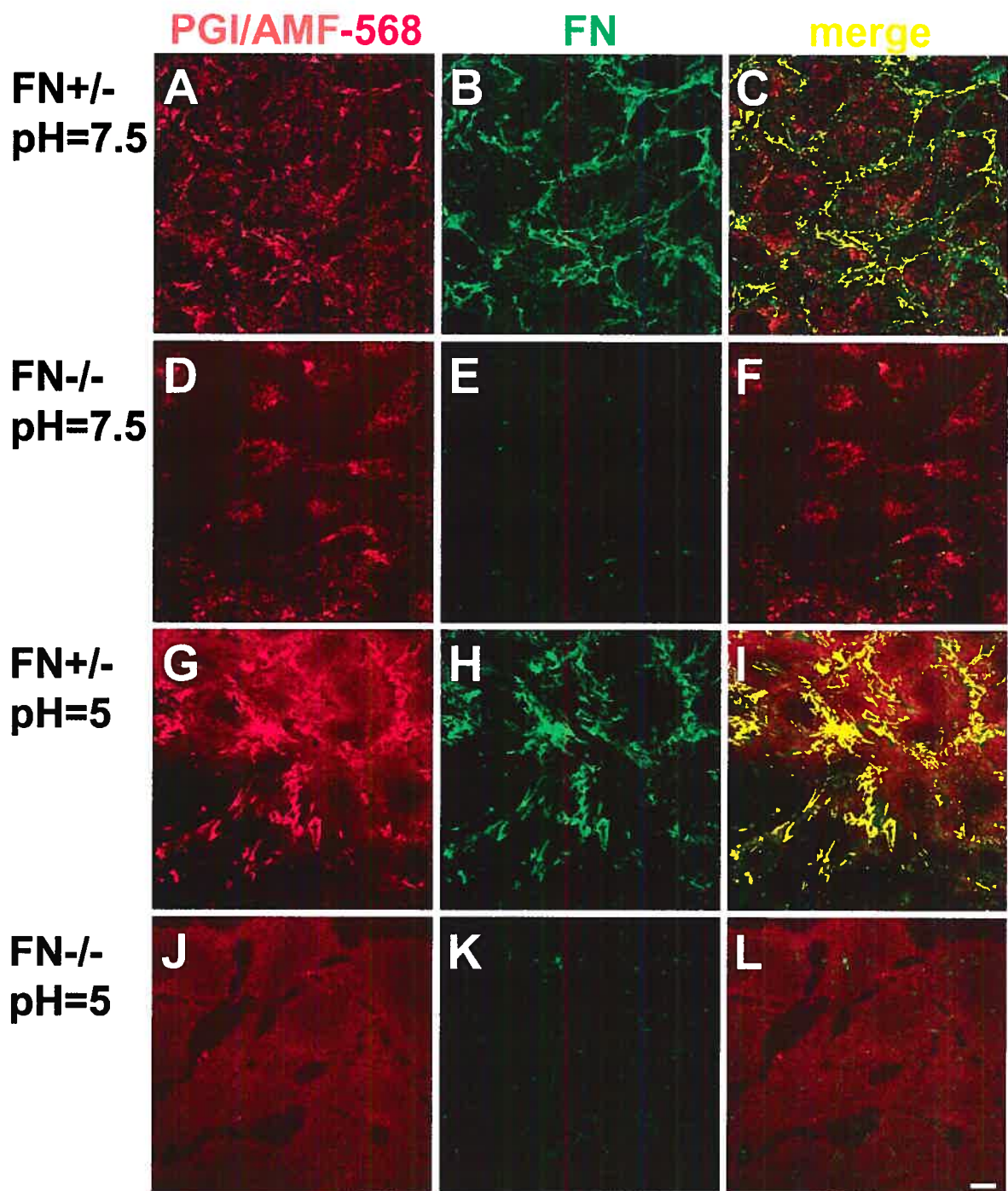


Figure 2: Cell surface PGI/AMF binding is specific for the fibrillar form of FN. NIH-3T3 cells were plated for 2 days on cover slips coated with 20 µg/ml of FN. The cells were then incubated with 25 µg/ml bPGI/AMF for 60 minutes at 37°C. After fixation with 3% paraformaldehyde, bPGI/AMF was revealed with Texas Red-streptavidin (A) and FN labelled with mouse anti-FN mAb and Alexa-488 conjugated anti-mouse secondary antibody (B). bPGI/AMF appears in red and FN in green and colocalisation of the two appears in yellow in the merged image (C). PGI/AMF binds selectively to the fibrillar form of FN in NIH-3T3 cells plated on a FN substrate. Bar: 20 µm.

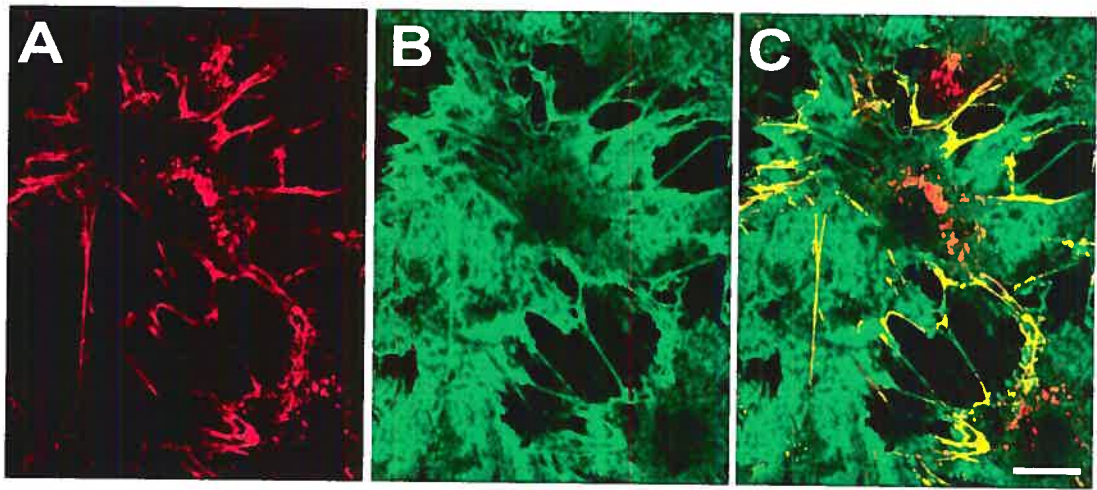
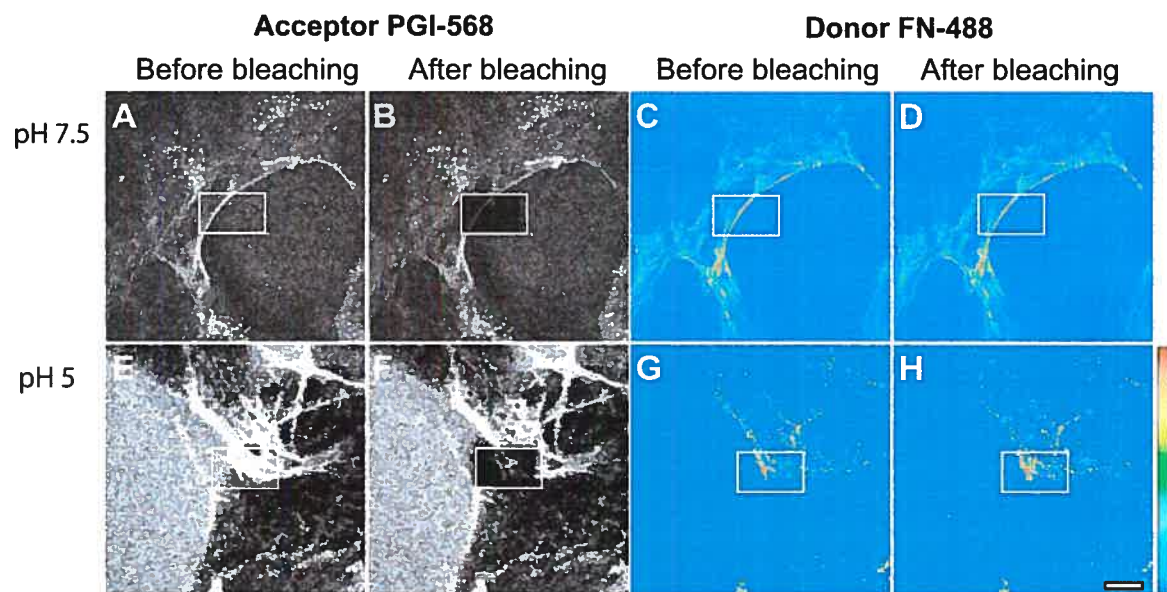


Figure 3: FRET analysis shows the direct interaction of PGI/AMF and FN at pH 5 but not at pH 7.5. NIH-3T3 cells incubated with FN-488 for 30 minutes at pH 7.5 in complete HEPES-buffered medium (A-D) and with PGI/AMF-568 for 30 minutes at pH 5 in complete MES-buffered medium (E-H) at 37°C were washed with PBS/CM, fixed with 3% paraformaldehyde and the cover slips mounted in Airvol for confocal photobleaching FRET analysis. Single scan images before bleaching of the acceptor PGI/AMF-568 (A, E) and donor FN-488 (C, G) were collected and then the acceptor was bleached to 60% to 90% in the zone of interest (indicated by the box). New single scan images were then acquired simultaneously for both the donor (B, F) and the acceptor (D, H). Donor images are presented in pseudocolor (see bar to right) to highlight increased donor fluorescence after acceptor photobleaching. The extent of bleaching (% bleach) and increased donor fluorescence (% FRET) in the bleached region was quantified and is presented in table form (I) for FN-488 and PGI/AMF-568 as donor/acceptor pairs at both pH 5 and 7.5. Negative controls include donor alone or acceptor alone at pH 7.5 or 5.0 and as a positive control FRET between FN-488 and FN-568 was measured, as indicated. p values were determined by ANOVA relative to the FN-488 - PGI/AMF-568 pair at pH 7.5.



I

pH	Donor	Acceptor	Number of Cells	%Bleach \pm SEM	%FRET \pm SEM (** p<0.01)
7.5	FN-488	PGI-568	29	77.5 \pm 1.2	1.02 \pm 0.8
7.5		PGI-568	15	69.2 \pm 3.5	0.22 \pm 1.6 ns
7.5	FN-488		22	0.56 \pm 2.9	1.56 \pm 0.4 ns
7.5	FN-488	FN-568	19	71.4 \pm 2.2	11.1 \pm 1.4 **
5	FN-488	PGI-568	30	69.2 \pm 2.8	14.6 \pm 1.5 **
5		PGI-568	8	67.9 \pm 3.1	-0.6 \pm 2.8 ns
5	FN-488		6	2.6 \pm 2.1	2.1 \pm 3.8 ns

Figure 4: Heparan sulphate (HS) does not affect the cell surface association of PGI/AMF at neutral pH. A) NIH-3T3 cells were left untreated or treated with 1, 10, 30 and 100 $\mu\text{g/ml}$ HS for 30 minutes at 37°C and then incubated for 30 minutes at 37°C with 25 $\mu\text{g/ml}$ PGI/AMF-568 in complete medium adjusted to pH 7.5 and total cell associated fluorescence measured. B) For cells treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ HS, FN was labeled with anti-FN mAb and Alexa-488 conjugated secondary antibodies and the graph presents the quantification of the fluorescent intensity of total cell-associated (Cell) and FN fibril-associated (FN) PGI/AMF in the absence (CTL; white bars) or presence of HS (+HS; green bars). PGI/AMF-A568 fluorescent intensity was quantified from 10 random images per condition and the data normalized to the condition presenting the maximum intensity (A, B; average of three independent experiments \pm SEM; $n=3$). Representative images of cells untreated (C) or pretreated with 10 $\mu\text{g/ml}$ HS (D) are shown with PGI/AMF-568 labeling in red and FN labeling in green. Bar: $20\mu\text{m}$.

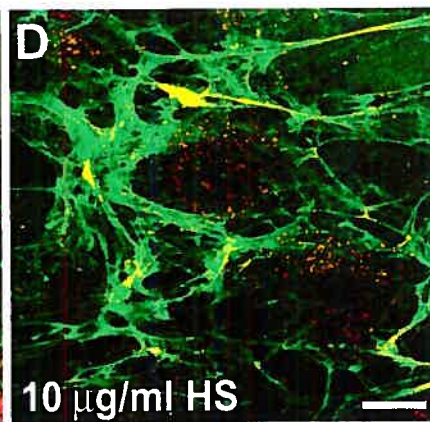
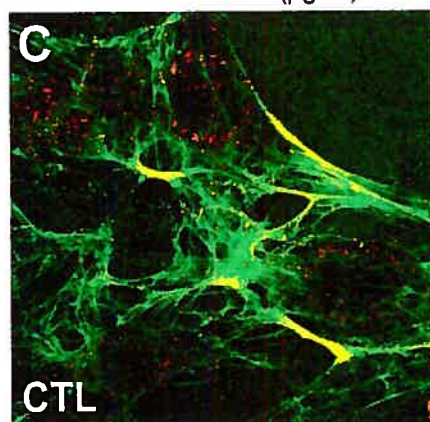
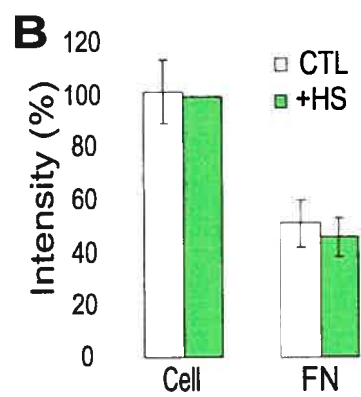
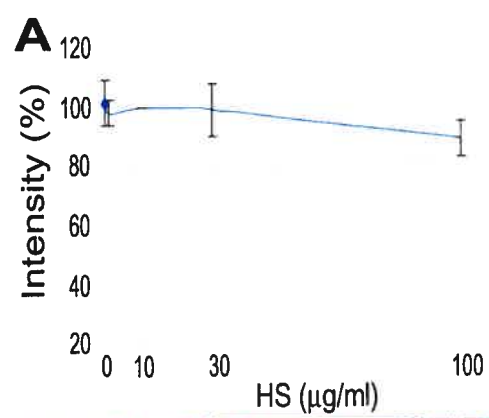


Figure 5: HS-stimulates the fibronectin-independent binding of PGI/AMF at pH 5. A. NIH-3T3 cells were left untreated or treated with 1, 10, 30 and 100 $\mu\text{g/ml}$ HS for 30 minutes at 37°C and then incubated for 30 minutes at 37°C with 5 $\mu\text{g/ml}$ PGI/AMF-568 in complete medium adjusted to pH 5 with 100 mM MES and total cell associated fluorescence measured. A selective increase in PGI/AMF-568 binding was detected at 10 $\mu\text{g/ml}$ HS at pH 5. B. For cells pretreated with 10 $\mu\text{g/ml}$ HS, FN was labeled with anti-FN mAb and Alexa-488 conjugated secondary antibodies and the graph presents the quantification of the fluorescent intensity of total cell-associated (Cell) and FN fibril-associated (FN) PGI/AMF in the absence (CTL; white and gray bars) or presence of HS (+HS; green bars). After incubation in the absence (CTL+COMP; grey bars) or presence of 10 $\mu\text{g/ml}$ HS (HS+COMP; dark green), PGI/AMF-568 binding was competed for by incubating the cells with 100 $\mu\text{g/ml}$ of unlabelled PGI/AMF before addition of 5 $\mu\text{g/ml}$ PGI/AMF-568 in complete medium adjusted to pH 5 with 100 mM MES. FN was labeled with anti-FN mAb and Alexa-488 conjugated secondary antibodies and the graph presents the quantification of the fluorescent intensity of total cell-associated (Cell) and FN fibril-associated (FN) PGI/AMF. PGI/AMF-A568 fluorescent intensity was quantified from 10 random images per condition and the data normalized to the condition presenting the maximum intensity (A, B; average of three independent experiments \pm SEM; $n=3$; * $p<0.01$ relative to control). Representative images in the absence (C) or presence (D) of 10 $\mu\text{g/ml}$ HS are shown with PGI/AMF-568 labeling in red and FN labeling in green. Bar: $20\mu\text{m}$.

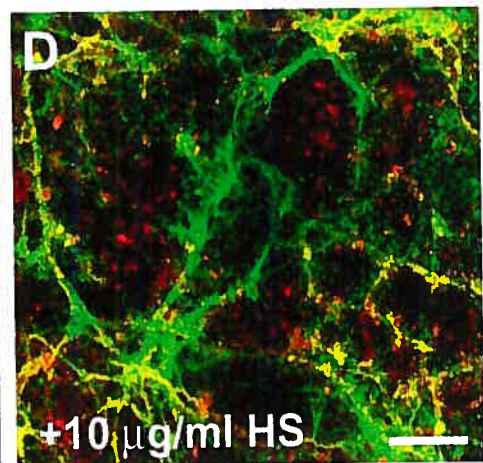
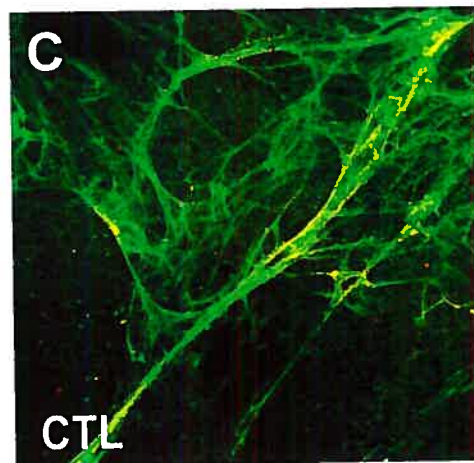
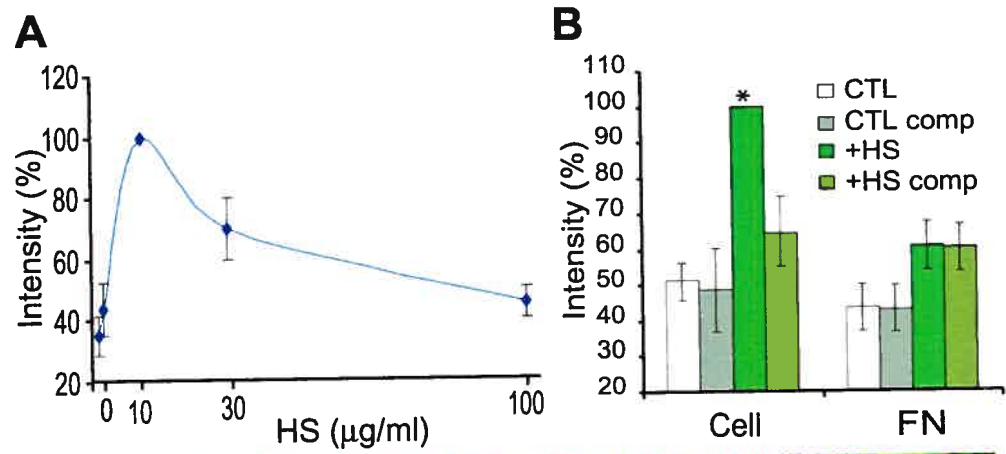


Figure 6: Heparan sulfate (HS) induces the FN-independent cell surface association of PGI/AMF at acid pH. FN^{-/-} cells were incubated in the absence of HS (A) or following pretreatment with 10 µg/ml HS (B) in complete medium adjusted to pH 5 with 100 mM MES for 60 minutes at 37°C and then incubated with 5 µg/ml PGI/AMF-568 at pH 5 for 60 minutes at 37°C and the distribution of AMF-568 determined by confocal microscopy. Quantification of the fluorescent intensity of cell-associated PGI/AMF for untreated (CTL) and treated (+HS) cells is presented graphically (C). Quantification was performed from 10 images of each condition; n=3; *p<0.01 relative to control.

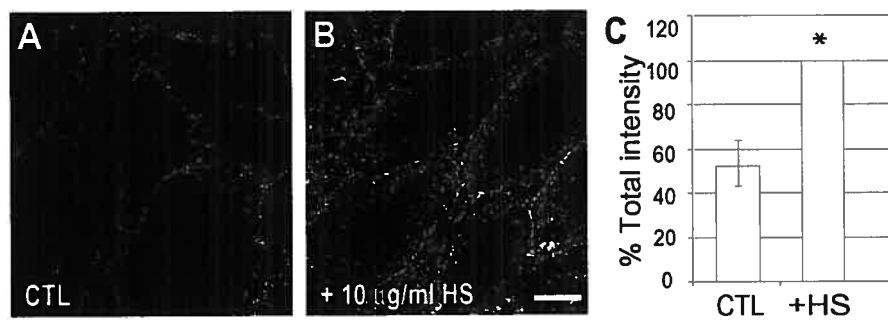


Figure 7: PGI/AMF endocytosis is required for its association with cell surface FN fibrils. NIH-3T3 cells were uninfected (A-C) or infected for 48 hours with adenoviruses expressing wild-type dynamin (dynWT) (D-F), the dominant negative dynamin K44A mutant (dynK44A) (G-I) and the dominant negative clathrin hub (Cla-Hub) (J-L). The cells were then incubated with 25 µg/ml of PGI/AMF-568 for 60 minutes (A, D, G, J) and fixed with 3% paraformaldehyde. Infection rates were from 50-80% and in the selected fields, all cells were infected. Uninfected, dynWT and dynK44A infected cells were labeling with mouse anti-HA antibody and goat Alexa-488 anti-mouse secondary antibody to identify infected cells (B, E, H) and clathrin hub infected cells were identified by labeling with mouse anti-T7 antibody followed by labeling with goat Alexa-488 anti-mouse secondary antibody (K). To ensure that the reduced fibril association of PGI/AMF in the infected cells was not due to decreased FN fibrillogenesis, parallel cultures were incubated with PGI/AMF-568 and then labeled for FN with anti-FN mAb and Alexa-488 conjugated secondary antibodies (C, F, I, L). As the anti-FN antibody used is of mouse origin, infected cells could not be identified by labeling with antibodies to the epitope tag, however the high infection rates ensured that the majority of cells were infected and for the dynK44A and Cla-Hub infections fields were selected that presented reduced endocytosis of PGI/AMF-568. Bar: 20 µm.

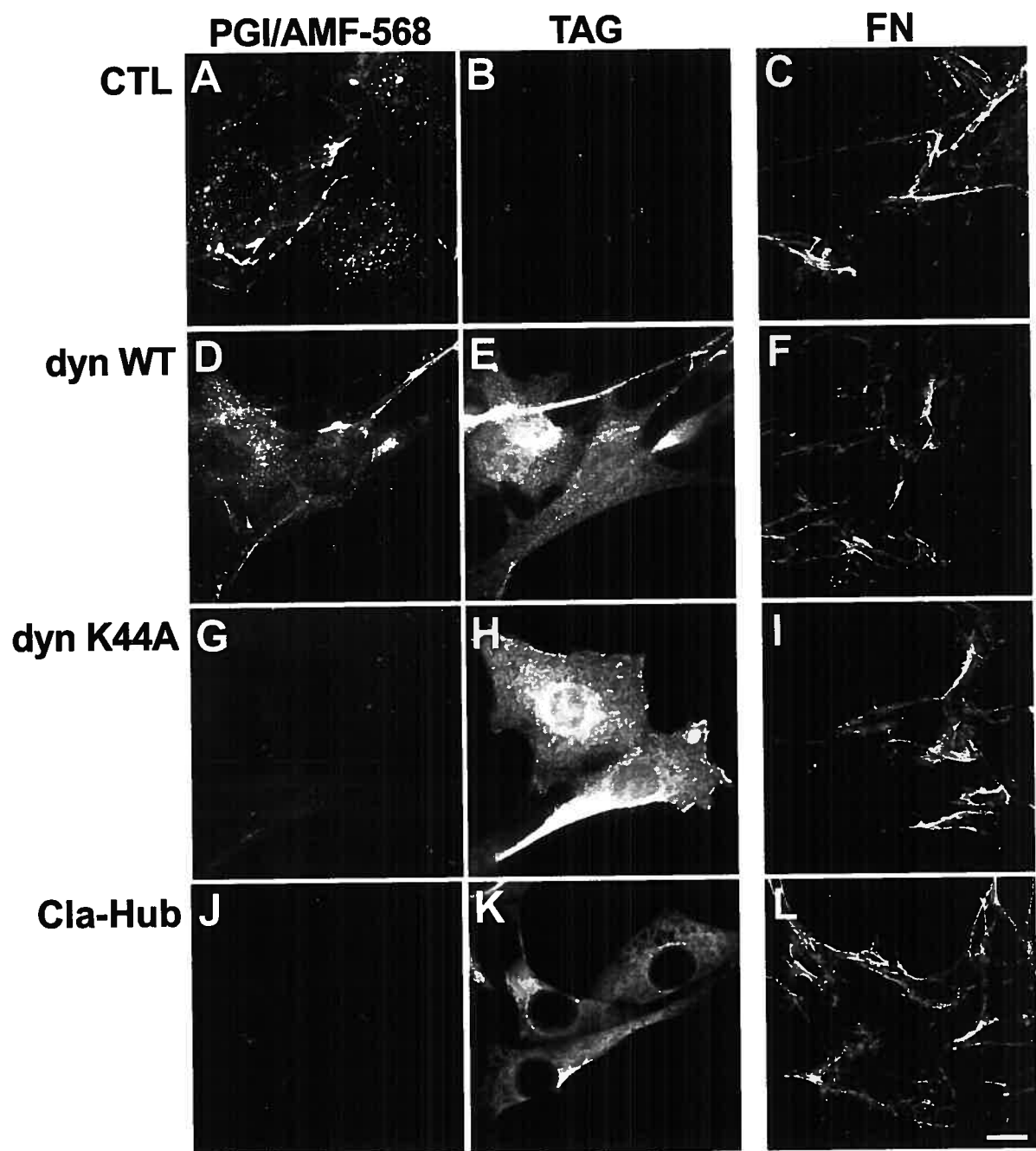


Figure 8: PGI/AMF and FN do not cointernalize and interact at the cell surface. NIH-3T3 cells were coincubated with 25 $\mu\text{g/ml}$ bPGI/AMF and 10 $\mu\text{g/ml}$ FN-FITC for 10 (A-C) or 60 (D-F) minutes at 37°C. The cells were then fixed with 3% paraformaldehyde and bPGI/AMF was revealed with Texas Red-streptavidin (A, D) and FN with anti-FN mAb and Alexa-488 conjugated secondary antibodies (B, E). Colocalization of the two appears in yellow in the merged images (C, F). Bar, 10 μm .

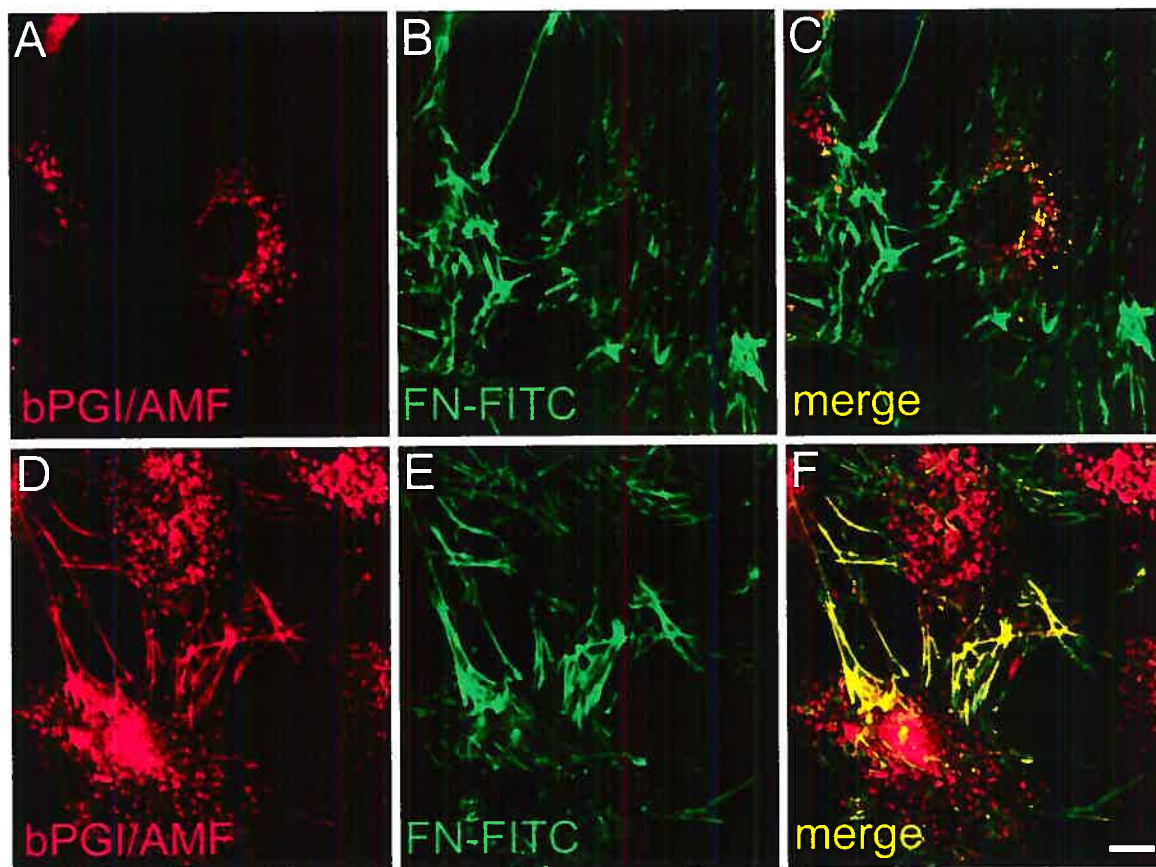


Figure 9: Endocytosed bPGI/AMF can undergo more than one cycle of endocytosis. NIH-3T3 cells were incubated with 25 µg/ml bPGI/AMF in complete medium (A-F) or with complete medium in the absence of bPGI/AMF (G-I) for 30 minutes at 37°C. The cells were then washed 3 times with complete medium and then incubated 30 minutes with Texas Red-streptavidin (SA-TR) at 37°C (A-C, G-I) or at 4°C (D-F). Cells were fixed with 3% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and labeled with FITC-streptavidin (SA-FITC) to detect endocytosed bPGI/AMF that had not been bound by Texas red-streptavidin (B, E, H). Texas Red (red) and FITC-streptavidin (green) confocal images were merged and confocal colocalisation appears in yellow (C, F, I). When added at 37°C (A-C) but not at 4°C (D-F), Texas Red-streptavidin can be seen to label PGI/AMF positive MVB and was therefore captured for a second round of endocytosis by recycling bPGI/AMF. Bar: 10 µm.

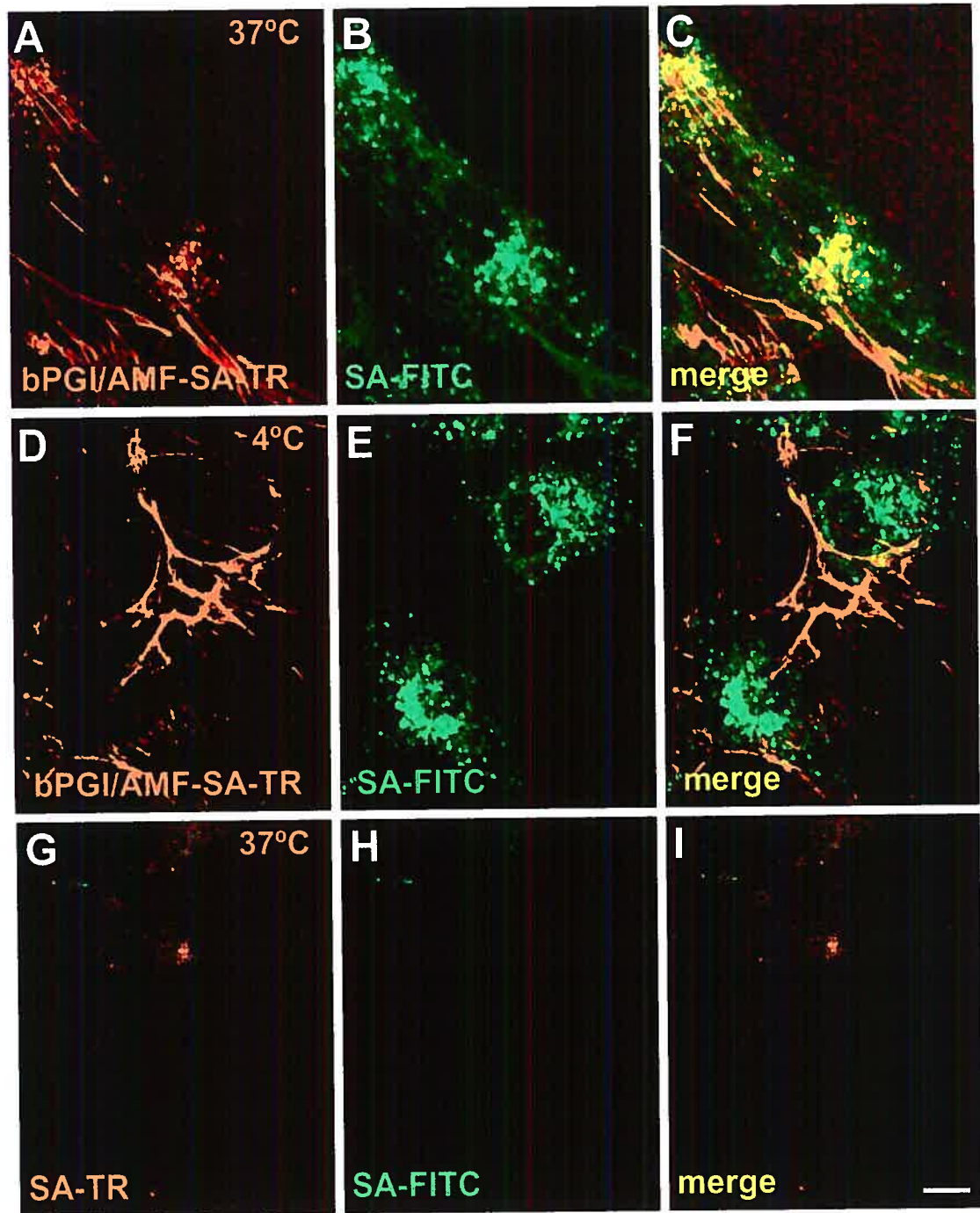
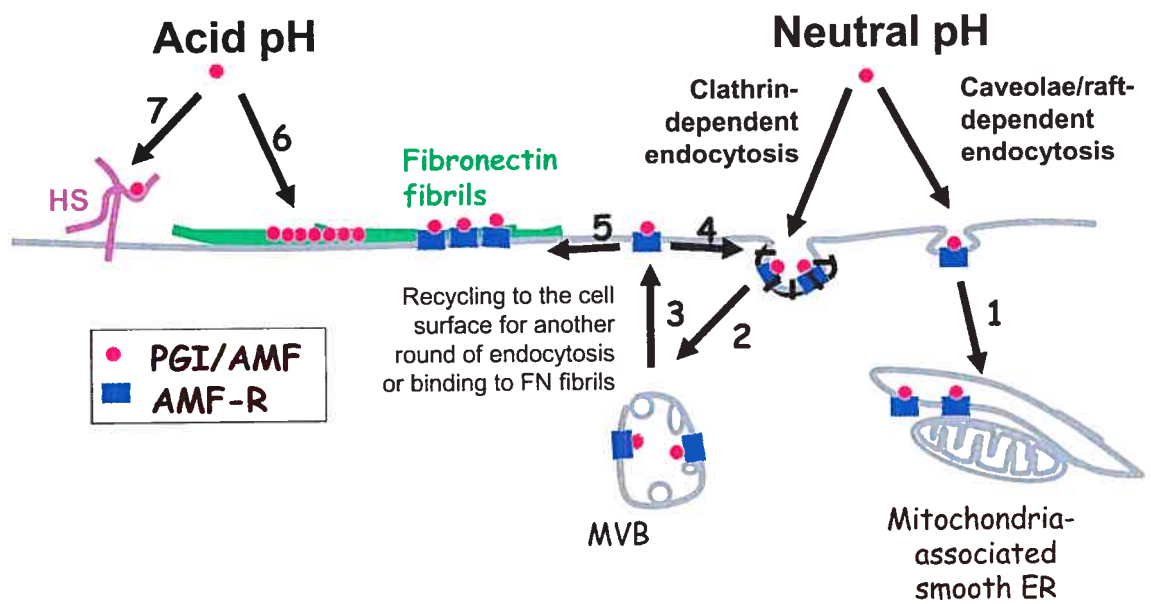


Figure 10: The complex biology of PGI/AMF and its receptor. At neutral pH, PGI/AMF binds its receptor AMFR at the cell surface and can be endocytosed via two different pathways: caveolae/raft-dependent endocytosis to the smooth ER (1) or clathrin-dependent endocytosis to multivesicular bodies (MVBs) (2). Internalized PGI/AMF can recycle from MVBs to the plasma membrane (3) where it can undergo further rounds of endocytosis and recycling (4). Recycling receptor-ligand complexes can also be sequestered via stable association with FN fibrils (5). At acid pH, endocytosis is inhibited and PGI/AMF binds directly to FN fibrils (6) or to heparan sulphate (HS) (7).



ARTICLE 3**MGAT5 EXPRESSION PROMOTES FIBRONECTIN
FIBRILLOGENESIS VIA A GALECTIN-3 MEDIATED
PATHWAY**

Annick Lagana, Emily Partridge, Jacky Goetz, Avraham Raz, James W. Dennis, and
Ivan R. Nabi

CONTRIBUTION DES AUTEURS

J'ai effectué toutes les expériences qui sont présentées dans cet article excepté le résultat présenté graphe A de la figure 1 et j'ai participé à la rédaction de l'article.

Emily Partridge a effectué le graphe A de la figure 1.

Jacky Goetz m'a montré la technique de mesure de motilité Wound Healing.

Avraham Raz nous a fourni la protéine galectine-3.

James W. Dennis nous a fourni les cellules épithéliales tumorales mammaires PyMT Mgat5. De plus, il a participé à la rédaction de l'article.

Mon directeur de recherche, **Le Dr Ivan R. Nabi**, m'a aidé tout au long de ce projet de recherche et a participé à la rédaction de l'article.

ABSTRACT

Fibronectin fibrillogenesis, cell spreading and motility require integrin activation and the dynamic remodelling of the actin cytoskeleton and focal contacts that are dependent on oncogenic signalling pathways. β 1,6-acetylglucosaminyltransferaseV, the *Mgat5* gene product, mediates the biosynthesis of β 1,6GlcNAc-branched N-glycans, the favoured ligand for endogenous galectins. Mice deficient in *Mgat5* display suppression of cancer growth and metastasis. Here we report that FN fibrillogenesis and FN-dependent cell spreading are deficient in *Mgat5*^{-/-} mammary epithelial tumor cells. FN fibrillogenesis and cell motility on a FN substrate require galectin-3 binding to *Mgat5*-modified N-glycans on cell surface receptors. Exogenous galectin-3 stimulated RGD-independent, PI3-K-dependent fibronectin matrix remodelling and cell motility in *Mgat5*^{+/-} cells while galectin-3 at higher concentrations was inhibitory. Our results indicate that the ratio of galectin-3 to *Mgat5*-modified glycoprotein ligands modulates integrin-mediated processes promoting remodelling of the extracellular matrix and tumor cell motility.

INTRODUCTION

Extracellular matrices (ECM) are rich in glycoconjugates that serve as scaffolds for cell migration, polarity and tissue organization. The deposition of FN provides positional information for mesodermal cell migration during early embryogenesis and during wound healing (Boucaut et al., 1990; Winklbauer and Nagel, 1991; Yost, 1992). The organization of microfilaments at focal adhesion sites exerts tension from inside the cell in response to integrin interaction with the ECM (Burridge and Chrzanowska-Wodnicka, 1996; Geiger et al., 2001; Hynes, 1992; Yamada and Miyamoto, 1995). At the same time, cell-mediated remodelling of the ECM is an active process and intracellular activation of integrins alters their affinity for extracellular ligands (Hynes, 2002).

The adhesion receptor $\alpha 5\beta 1$ integrin binds fibronectin forming receptor clusters recruiting paxillin, talin, and vinculin as well as tyrosine kinases and phosphatases to form adhesion complexes. Interaction with integrins induces a conformational change in soluble FN dimers that enables their assembly into fibrils and the formation of a fibrillar network. FN fibril elongation involves centripetal tensin-dependent translocation of $\alpha 5\beta 1$ integrin along actin stress fibers (Ohashi et al., 2002; Pankov et al., 2000; Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer, 2003; Zamir and Geiger, 2001). Fibrillogenesis also requires FAK (focal adhesion kinase), Src kinase, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) (Chen et al., 1996; Schaller and Parsons, 1994; Xing et al., 1994) and adaptor proteins such as Grb7, Grb2 and p130cas (Han and Guan, 1999; Schlaepfer et al., 1999). FAK-deficient cells fail to translocate integrin-bound FN along actin filaments to form mature fibrillar adhesions

(Ilic et al., 2004). Ilic et al (Ilic et al., 2004) suggested that the FN fibril defect in *Fak*^{-/-} cells is due to a failure of post-adhesive cytoskeletal reorganization and adhesion site remodelling that is required to support normal FN matrix deposition and patterning (Ilic et al., 2004).

The galectins are a family of N-acetyllactosamine-binding proteins that bind to N-glycans in the extracellular domain of integrins and other receptors (Ochieng et al., 1998). Galectin-8 in the substratum supports integrin clustering, and integrin-mediated signaling, but in excess as a soluble ligand, galectin-8 binds integrins and negatively regulates cell adhesion (Levy et al., 2001). We recently reported that galectin-3 cross-links N-glycans on cytokine receptor kinases in a poly-N-acetyllactosamine-dependent manner, forming a molecular scaffold or lattice that retains receptors at the cell surface (Partridge et al., 2004). Golgi Mgat5 (β 1,6 N-acetylglucosaminyltransferase V) catalyzes the addition of β 1,6GlcNAc to complex type N-glycans, and these are elongated with poly N-acetyllactosamine (Gal- β 1,4-GlcNAc)_n, the preferred ligand for galectin-3 (Barboni et al., 2000; Henrick et al., 1998; Perillo et al., 1998; Yu et al., 2002). In cultured cells, expression of Mgat5 is associated with reduced cell adhesion on collagen IV and FN substrates and increased cell motility and tumor formation without affecting cell surface expression of α 5 β 1 and α v β 3 integrins (Demetriou et al., 1995b; Guo et al., 2001). Moreover, mammary tumor cell lines derived from polyoma middle T oncogene (PyMT) transgenic mice on a *Mgat5*^{-/-} background, deficient in ligands attached to N-glycans that bind to galectins, exhibit reduced peripheral focal contacts, motility and propensity to metastasize when compared to *Mgat5*^{+/+} wild type cells (Granovsky et al., 2000). These phenotypes are rescued by retroviral expression of Mgat5 in the

Mgat5^{-/-} tumor cells (Granovsky et al., 2000; Partridge et al., 2004). Here we examine the requirements for galectin ligands and galectin-3 in integrin-mediated FN fibrillogenesis.

RESULTS AND DISCUSSION

Wild-type *Mgat5*^{+/+} mammary tumor cells show FN-dependent spreading response, however the deficient spreading of *Mgat5*^{-/-} mammary tumor cells is not rescued by spreading on a FN substrate (Figure 1 A). *Mgat5*^{-/-} tumor cells also present a significant reduction in cellular expression of FN, but not of another ECM protein, laminin, that could be rescued by retroviral expression of *Mgat5* (Figure 1). Furthermore, in contrast to wild-type and rescue cells that express elaborate fibrillar FN networks, *Mgat5*^{-/-} tumor cells present little FN labeling and an absence of FN fibrils (Figure 1 C-E). On plastic in serum-depleted medium for 24 hours, all three cell lines are deficient for FN fibrillogenesis (not shown). However, when plated in serum-free conditions on a 10 µg/ml FN substrate, wild-type and rescue cell lines but not *Mgat5*^{-/-} tumor cells are able to reorganize the exogenous substrate FN into fibrils (Figure 2 A-C, F). Inhibition of terminal N-glycan processing with the α -mannosidase II inhibitor swainsonine and of galectin binding with 50 mM β -lactose prevented FN fibrillogenesis of both wild type and rescue cells (Figure 2 D-F). FAK localization to focal contacts is crucial for FN fibrillogenesis (Ilic et al., 2004) and *Mgat5*^{-/-} cells present fewer and less-organized focal contacts (Granovsky et al., 2000). β 1-integrin does not localize to the paxillin-labeled focal contacts of *Mgat5*^{-/-} cells, however inhibition of fibrillogenesis by swainsonine or β -lactose is not associated with disruption of the focal contact distribution of either β 1-integrin or FAK (not shown).

β 1-6 branched N-glycans and galectins do not therefore regulate FN fibrillogenesis by altering the focal contact distribution of these proteins.

Addition of recombinant galectin-3 to the cell medium stimulates FN matrix remodelling of wild type cells plated on a FN substrate in a dose-dependent manner with maximum efficiency at a concentration of 1 μ g/ml (Figure 2 G-I). Galectin-3 does not stimulate FN substrate remodelling of *Mgat5*^{-/-} tumor cells demonstrating the importance of interaction of *Mgat5* gene products with the carbohydrate recognition domain (CRD) of galectin-3 in FN remodelling (Figure 2 I). *Mgat5*^{-/-} cells exhibit reduced motile capability relative to wild-type cells (Partridge et al., 2004) and addition of galectin-3 stimulates migration of wild-type cells but not of *Mgat5*^{-/-} cells plated on a FN substrate using a wound-healing assay (Figure 3 A-D). Galectin-induced motility stimulation of wild type cells is selective for cells plated on an FN substrate and exhibits a concentration dependence that is centered around 2 μ g/ml, slightly greater than the peak concentration for FN fibrillogenesis and likely due to the enhanced cell density used in the wound healing assay (Figure 3 E).

Both FN and its receptor, α 5 β 1 integrin, express β 1-6 branched N-glycans and interact with galectins (Nakagawa et al., 1996; Ochieng et al., 1998). By immunoblot, β 1 integrin migrates faster in *Mgat5*^{-/-} cells than in wild-type and rescue cell lines and immunoprecipitated β 1 integrin was labeled with β 1-6 branched N-glycan specific lectin L-PHA in wild type and rescue but not *Mgat5*^{-/-} cells (Figure 4 A). Isolation of proteins carrying β 1-6 branched N-glycans with L-PHA agarose showed a complete absence of L-PHA-HRP reactive bands in total cell lysates of *Mgat5*^{-/-} cells confirming the *Mgat5* deletion in this cell type. β 1 integrin and FN could both be detected in the L-PHA isolates of wild-type and rescue cells by

immunoblotting (Figure 4 A). Since fibrillogenesis in serum-free conditions uses exogenous substrate FN (Figure 2), we blotted 1 μ g of commercial FN with anti-FN antibody and L-PHA-HRP (Figure 4 B). Even after extended exposure, we were unable to detect expression of β 1-6 branched N-glycans on commercial FN excluding the possibility that galectin binding to FN stimulates FN fibrillogenesis.

The RGD domain is an integrin binding domain found in different extracellular matrix proteins, including FN, implicated in integrin-mediated remodelling of the extracellular matrix (Hynes, 1990). We used RGD peptides to test the role of integrin-FN interaction in galectin-mediated fibrillogenesis. Addition of RGD containing peptides to *Mgat5*^{+/+} wild-type cells prevents their ability to reorganize substrate FN into fibrils (Figure 4 C, D). However, RGD did not inhibit FN matrix remodelling induced by galectin-3 and indeed stimulated the incorporation of exogenous FN into fibrils (Figure 4 E, G). In contrast to the RGD-dependent motility of wild-type cells in the absence of exogenous galectin-3 on FN or plastic, galectin-3 stimulated motility on FN is not inhibited by RGD (Figure 4 H). Modulation of cell-substrate binding by either regulating cellular expression of integrins or density of substrate FN is a critical determinant of the cell's ability to move (Palacek et al., 1997). The RGD-independent stimulation by galectin-3 binding of both FN fibrillogenesis and cell motility on a FN substrate argues that galectin-3 binding to integrin is modulating the nature of FN-integrin interaction to favour FN fibrillogenesis and stimulate cell motility.

β -lactose inhibited stimulation of FN fibrillogenesis by galectin-3 in the presence of RGD peptide defining galectin-3-mediated fibrillogenesis as a glycan-dependent, RGD-independent process (Figure 5 A). We then tested whether

galectin-3-mediated fibrillogenesis was associated with the PI3-K and FAK signaling events associated with integrin-mediated FN fibrillogenesis (Chen et al., 1996; Ilic et al., 2004; Schaller and Parsons, 1994; Xing et al., 1994). Galectin-3 induced fibrillogenesis, either alone or in the presence of RGD, was inhibited in the presence of the PI3-K inhibitor LY294002 (Figure 5 A). Addition of galectin-3 or galectin-3 plus RGD peptides resulted in activation of both FAK and Akt that was sensitive to lactose and therefore galectin-mediated (Figure 5 B). While galectin-3 induced activation of FAK P397 was essentially equivalent in the absence or presence of RGD peptide, Akt activation was greater in the added presence of RGD than with galectin-3 alone (Figure 5 B). Treatment with LY294002 completely inhibited activation of Akt but only slightly reduced FAK activation (Figure 5 B). Galectin-3 binding therefore stimulates integrin activation of FAK independently of PI3-K and disruption of RGD-mediated integrin-FN interactions favors galectin mediated activation of downstream activation of PI3-K signaling.

The synergistic increase in fibrillogenesis and downstream Akt signalling induced by galectin-3 in the presence of RGD peptides (Figures 4, 5) demonstrates that regulation of RGD-dependent integrin interaction with FN impacts on galectin-3 mediated fibrillogenesis and downstream PI3-K signaling. Adhesion-dependent activation of Akt by integrin can occur independently of FAK and Src (Velling et al., 2004). Similarly, the ability of RGD peptide to enhance galectin stimulation of Akt without affecting FAK activation levels (Figure 5) argues that disruption of RGD based FN binding is facilitating integrin-dependent Akt activation via an alternate pathway. Activation of the PI3-K pathway is generally repressed in *Mgat5*^{-/-} cells and galectin binding to wild-type cells induces a functionally modified receptor lattice for

the TCR and TGF- β -R that signals via PI3-K (Demetriou et al., 2001; Partridge et al., 2004). Similarly, recruitment of integrin to the galectin lattice may modulate integrin-mediated activation of PI3-K. Cytokine receptor tyrosine kinases colocalize with integrin receptors in remodelling membranes and clustering of cytokine receptors with integrins enhances focal adhesion signalling by stimulating Src activation (Schwartz and Ginsberg, 2002). Synergistic activation of various receptor complexes via the galectin lattice may contribute to localize signal activation leading to FN polymerization and cell migration.

Stimulation of cell growth by fibronectin polymerization can occur via both RGD-dependent and -independent mechanisms with the latter shown to be mediated by heparin proteoglycans (Sottile et al., 2000). Proteoglycans are not however substrates for N-glycan specific Mgat5. Knockout mice for integrin $\alpha 5$ are still able to stimulate FN matrix formation (Yang et al., 1993) and overexpression of integrin $\alpha 4 \beta 1$, that binds to FN in an RGD-independent manner, induced FN fibrillogenesis in CHO cells depleted of $\alpha 5$ integrin (Sechler et al., 2000). The ability of lactose and RGD peptide to independently inhibit fibrillogenesis in the absence of added exogenous galectin-3 argues that cooperative interaction between galectin and RGD-mediated integrin binding is required to initiate FN fibrillogenesis, at least in these mammary tumor derived cell lines (Figures 2, 4). Mgat5/galectin-3 mediated stimulation of FN fibrillogenesis via an RGD-independent pathway identifies a novel mechanism for ECM reorganization.

A fibronectin-dependent role for galectin-3 function in cell adhesion and motility could explain the discordant data obtained with respect to the role of galectin-3 expression in cell adhesion, cell motility and tumor metastasis (Takenaka

et al., 2004). Interestingly, galectin-3 enhances the migration of primary non-invasive tumour cells through Matrigel but not of most metastatic cells (Le Marer and Hughes, 1996). Mgat5 expression plays a critical role in early stages of cell transformation and tumorigenesis (Demetriou et al., 1995a; Granovsky et al., 2000) and polylectosamine chain extension is directly associated with tumor malignancy. Cellular transformation is associated with reduction of FN expression in cultured cells (Hynes and Wyke, 1975; Olden and Yamada, 1977) and FN expression in tumors varies dramatically. Differential expression of Mgat5, FN and galectin-3 depending on the type and state of advancement of the tumor would therefore impact on the ability of galectin-3 to stimulate FN fibrillogenesis and such that the role of galectin-3 in tumor cell motility, invasion and metastasis could vary.

MATERIAL AND METHODS

Antibodies and reagents

Bovine plasmatic fibronectin, bovine serum albumin solution (BSA 30%), rabbit anti-laminin and mouse anti- β -actin antibodies, swainsonine (SW), β -lactose, RGD peptide, LY294002 were purchased from Sigma (Oakville, ON). Mouse anti-fibronectin antibody was purchased from Transduction Laboratories (Mississauga, ON), rat anti-integrin β 1 antibody and mouse anti-paxillin antibody from Chemicon (Temecula, CA) and rabbit anti-FAK-P397, anti-FAK, anti-Akt-pSer-473, and anti-Akt antibody from Biosource International (Camarillo, Ca). FITC and HRP-conjugated rat, mouse and rabbit secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Phalloidin and secondary

antibodies conjugated to Alexa-488, -568, or -647 were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). L-PHA gel and L-PHA HRP were purchased from EY Laboratories (San Mateo, CA). Protein G sepharose was purchased from Invitrogen Canada Inc. (Burlington, ON). Human recombinant galectin-3 was produced as previously described (Gong et al., 1999).

Cell Culture

Wild-type and *Mgat5*^{-/-} epithelial mammary tumor cells were isolated and cloned from *Mgat5* deficient mice crossed with mice expressing the PyMT oncogene (Granovsky et al., 2000). PyMT *Mgat5*^{-/-} cells were rescued by infection with a retroviral *Mgat5* expression vector (Granovsky et al., 2000). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with non-essential amino acids, vitamins, glutamine, penicillin-streptomycin (Canadian Life Technologies) and 10% fetal bovine serum (FBS) (Immunocorp, Laval, QC) at 37°C in a humidified 5% CO₂/95% air incubator. Where indicated, cover slips were coated with fibronectin by incubation with 200 µl of a solution of 10 µg/ml of fibronectin in PBS for 30 minutes at room temperature and then washed 3 times with PBS before plating the cells.

Immunofluorescence labeling.

Cells were plated on glass cover slips, where indicated coated with 10 µg/ml of fibronectin, for 2 days at 37°C in a humidified 5% CO₂/95% air incubator in complete medium for 5 hours and then for 2 days in serum-free medium supplemented with 1 µg/ml swainsonine, 20 mM β-lactose, 100 µg/ml RGD, or 50 µM LY294002 together with the indicated concentrations of recombinant galectin-3. Cells were washed with PBS (pH 7.4) supplemented with 0.1 mM Ca²⁺ and 1 mM

Mg²⁺ (PBS/CM) and then fixed with 3% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. After fixation, cells were rinsed extensively with PBS and permeabilized with 0.1 % Triton X-100 in PBS/CM containing 0.5% BSA for 15 min to reduce non-specific binding. Subsequent washing and incubations with phalloidin, primary and fluorescent secondary antibodies were done in PBS/CM containing 0.2% BSA. After labeling, the cover slips were mounted in Airvol (Air Products Inc, Allentown, PA) and viewed with the 63X Plan Apochromat objective of a Leica TCS-SP1 confocal microscope or with the 40X objective of a Zeiss Axiophot fluorescence microscope equipped with a Retiga CCD camera. Fibronectin fibrillogenesis of cells plated on a fibronectin substrate was quantified from images of slides labeled in parallel for each experiment and acquired with equivalent acquisition parameters. Threshold levels were established across the series of slides from each experiment that selected for fibrillar fibronectin and excluded substrate fibronectin labeling using Northern Eclipse image analysis software (Empix Imaging, Mississauga, ON).

Immunoblot and Immunoprecipitation

For immunoblot experiments, cells cultured at 80% confluence and washed three times with ice cold PBS/CM were scraped, lysed, and sonicated in lysis buffer containing 1% SDS, 5 mM EDTA, and 1 X Complete Mini (protease inhibitor cocktail tablets) (Roche, Laval, QC). For immunoprecipitation experiments, cells were scraped and lysed in extraction buffer (EB) containing 25 mM Tris, pH 7.5, 25 mM glycine, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, and protease inhibitor cocktail. Protein content was assayed using the BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL). Integrin β 1 was immunoprecipitated with rat anti-integrin β 1 and protein G agarose beads and β 1-6 branched N-glycan proteins precipitated with L-

PHA agarose. To measure FAK-P397 and Akt ser-473 expression, cells were cultured at 60-70% confluence on Petri dishes coated with 10 µg/ml fibronectin. Cell monolayers were washed three times with ice cold PBS/CM, lysed with 400 µl of hot (95°C) reducing Laemmli buffer, scraped and sonicated. Equal protein concentrations were loaded onto a 7.5% SDS-PAGE and transferred onto Hybond C extra nitrocellulose membrane (Amersham). The blots were blocked with 5% non-fat dry milk in PBS or with 5% BSA in TBS (Tris-base, NaCl, pH7.6) complemented with 0.1% tween for both primary and secondary antibody labelling, and with 2% BSA in PBS/Tween 0.1% buffer for L-PHA HRP labelling. The labeled bands were revealed by chemiluminescence and exposed to preflashed Kodak XRP-1 film.

Wound Healing

PyMT mammary tumor cells were plated on 35 mm plastic dishes coated with 10 µg/ml of fibronectin for 2 days at 37°C in a humidified 5% CO₂/95% air incubator in complete DMEM until 90% confluency. The cells were grown for 1 day in serum-free medium before wounding of the monolayer by scraping from the middle of the plate and incubation of the cells in serum-free medium supplemented with 20 mM β-lactose, 50 µM LY294002 and indicated concentrations of recombinant galectin-3 and RGD. Cells were then fixed after 1 day and images collected with a 20X objective. Images were analysed and cell motility quantified with Northern Eclipse image analysis software by measuring the distance from the scrape of the 10 most motile cells for 4 fields of each conditions.

REFERENCES

- Barboni, E.A., S. Bawumia, K. Henrick, and R.C. Hughes. 2000. Molecular modeling and mutagenesis studies of the N-terminal domains of galectin-3: evidence for participation with the C-terminal carbohydrate recognition domain in oligosaccharide binding. *Glycobiology*. 10:1201-1208.
- Boucaut, J.C., K.E. Johnson, T. Darribere, D.L. Shi, J.F. Riou, H.B. Bache, and M. Delarue. 1990. Fibronectin-rich fibrillar extracellular matrix controls cell migration during amphibian gastrulation. *Int J Dev Biol*. 34:139-147.
- Burridge, K., and M. Chrzanowska-Wodnicka. 1996. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 12:463-518.
- Chen, H.C., P.A. Appeddu, H. Isoda, and J.L. Guan. 1996. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 271:26329-26334.
- Demetriou, M., M. Granovsky, S. Quaggin, and J.W. Dennis. 2001. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature*. 409:733-739.
- Demetriou, M., I.R. Nabi, M. Capaleno, S. Dedhar, and J.W. Dennis. 1995a. Serum-independent growth, apoptosis and reduced substrate adhesion in epithelial cells expressing GlcNAc-transferase V. *Journal of Cell Biology*. 130:383-392.
- Demetriou, M., I.R. Nabi, M. Coppelino, S. Dedhar, and J.W. Dennis. 1995b. Reduced contact-inhibition and substratum adhesion in epithelial cells expressing GlcNAc-transferase V. *J Cell Biol*. 130:383-392.
- Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov, and K.M. Yamada. 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:793-805.

- Gong, H.C., Y. Honjo, P. Nangia-Makker, V. Hogan, N. Mazurak, R.S. Bresalier, and A. Raz. 1999. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. *Cancer Res.* 59:6239-6245.
- Granovsky, M., J. Fata, J. Pawling, W.J. Muller, R. Khokha, and J.W. Dennis. 2000. Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice. *Nat Med.* 6:306-312.
- Guo, H.B., Y. Zhang, and H.L. Chen. 2001. Relationship between metastasis-associated phenotypes and N-glycan structure of surface glycoproteins in human hepatocarcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 127:231-236.
- Han, D.C., and J.L. Guan. 1999. Association of focal adhesion kinase with Grb7 and its role in cell migration. *J Biol Chem.* 274:24425-24430.
- Henrick, K., S. Bawumia, E.A. Barboni, B. Mehul, and R.C. Hughes. 1998. Evidence for subsites in the galectins involved in sugar binding at the nonreducing end of the central galactose of oligosaccharide ligands: sequence analysis, homology modeling and mutagenesis studies of hamster galectin-3. *Glycobiology.* 8:45-57.
- Hynes, R.O. 1990. Fibronectins. 546 pp.
- Hynes, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69:11-25.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell.* 110:673-687.
- Hynes, R.O., and J.A. Wyke. 1975. Alterations in surface proteins in chicken cells transformed by temperature-sensitive mutants of Rous sarcoma virus. *Virology.* 64:492-504.

- Ilic, D., B. Kovacic, K. Johkura, D.D. Schlaepfer, N. Tomasevic, Q. Han, J.B. Kim, K. Howerton, C. Baumbusch, N. Ogiwara, D.N. Streblow, J.A. Nelson, P. Dazin, Y. Shino, K. Sasaki, and C.H. Damsky. 2004. FAK promotes organization of fibronectin matrix and fibrillar adhesions. *J Cell Sci.* 117:177-187.
- Le Marer, N., and R.C. Hughes. 1996. Effects of the carbohydrate-binding protein galectin-3 on the invasiveness of human breast carcinoma cells. *J Cell Physiol.* 168:51-58.
- Levy, Y., R. Arbel-Goren, Y.R. Hadari, S. Eshhar, D. Ronen, E. Elhanany, B. Geiger, and Y. Zick. 2001. Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion. *J Biol Chem.* 276:31285-1295.
- Nakagawa, H., M. Zheng, S. Hakomori, Y. Tsukamoto, Y. Kawamura, and N. Takahashi. 1996. Detailed oligosaccharide structures of human integrin alpha 5 beta 1 analyzed by a three-dimensional mapping technique. *Eur J Biochem.* 237:76-85.
- Ochieng, J., M.L. Leite-Browning, and P. Warfield. 1998. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun.* 246:788-791.
- Ohashi, T., D.P. Kiehart, and H.P. Erickson. 2002. Dual labeling of the fibronectin matrix and actin cytoskeleton with green fluorescent protein variants. *J Cell Sci.* 115:1221-1229.
- Olden, K., and K.M. Yamada. 1977. Mechanism of the decrease in the major cell surface protein of chick embryo fibroblasts after transformation. *Cell.* 11:957-969.

- Palacek, S.P., J.C. Loftus, M.H. Ginsberg, D.A. Lauffenberger, and A.F. Horwitz. 1997. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*. 385:537-540.
- Pankov, R., E. Cukierman, B.Z. Katz, K. Matsumoto, D.C. Lin, S. Lin, C. Hahn, and K.M. Yamada. 2000. Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of alpha(5)beta(1) integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol*. 148:1075-1090.
- Partridge, E.A., C. Le Roy, G.M. Di Guglielmo, J. Pawling, P. Cheung, M. Granovsky, I.R. Nabi, J.L. Wrana, and J.W. Dennis. 2004. Regulation of Cytokine Receptors by Golgi N-Glycan Processing and Endocytosis. *Science*. 306:120-124.
- Perillo, N.L., M.E. Marcus, and L.G. Baum. 1998. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med*. 76:402-412.
- Schaller, M.D., and J.T. Parsons. 1994. Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 6:705-710.
- Schlaepfer, D.D., C.R. Hauck, and D.J. Sieg. 1999. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol*. 71:435-478.
- Schwartz, M.A., and M.H. Ginsberg. 2002. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol*. 4:E65-E68.
- Sechler, J.L., A.M. Cumiskey, D.M. Gazzola, and J.E. Schwarzbauer. 2000. A novel RGD-independent fibronectin assembly pathway initiated by alpha4beta1 integrin binding to the alternatively spliced V region. *J Cell Sci*. 113 (Pt 8):1491-1498.

- Sottile, J., D. Hocking, and K. Langenbach. 2000. Fibronectin polymerization stimulates cell growth by RGD-dependent and -independent mechanisms. *J Cell Sci.* 113:4287-4299.
- Takenaka, Y., T. Fukumori, and A. Raz. 2004. Galectin-3 and metastasis. *Glycoconj J.* 19:543-549.
- Velling, T., S. Nilsson, A. Stefansson, and S. Johansson. 2004. beta1-Integrins induce phosphorylation of Akt on serine 473 independently of focal adhesion kinase and Src family kinases. *EMBO Rep.* 5:901-5.
- Wierzbicka-Patynowski, I., and J.E. Schwarzbauer. 2003. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J Cell Sci.* 116:3269-3276.
- Winklbauer, R., and M. Nagel. 1991. Directional mesoderm cell migration in the *Xenopus* gastrula. *Dev Biol.* 148:573-589.
- Xing, Z., H.C. Chen, J.K. Nowlen, S.J. Taylor, D. Shalloway, and J.L. Guan. 1994. Direct interaction of v-Src with the focal adhesion kinase mediated by the Src SH2 domain. *Mol Biol Cell.* 5:413-421.
- Yamada, K.M., and S. Miyamoto. 1995. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Opin Cell Biol.* 7:681-689.
- Yang, J.T., H. Rayburn, and R.O. Hynes. 1993. Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Development.* 119:1093-1105.
- Yost, H.J. 1992. Regulation of vertebrate left-right asymmetries by extracellular matrix. *Nature.* 357:158-161.
- Yu, F., R.L. Finley, Jr., A. Raz, and H.R. Kim. 2002. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem.* 277:15819-15827.

Zamir, E., and B. Geiger. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* 114:3583-3590.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: *Mgat5*^{-/-} cells exhibit a deficient spreading response to fibronectin, reduced endogenous FN expression and impaired FN fibrillogenesis. Cell spreading of wild-type and *Mgat5*^{-/-} PyMT mammary tumor cells was measured on a FN substrate at the indicated concentrations (A). Total cell lysates (40 µg protein) of wild type, *Mgat5*^{-/-} and *Mgat5* rescued PyMT mammary tumor cell lines were blotted for FN, laminin and actin, as indicated (B). Molecular mass markers (in kDa) are indicated and the graph shows the densitometric quantification of band intensity (n = 3). Wild type (C), *Mgat5*^{-/-} (D) and *Mgat5* rescued (E) cells were fixed and labeled with mouse anti-FN mAb and Alexa-568 conjugated anti-mouse secondary antibody.

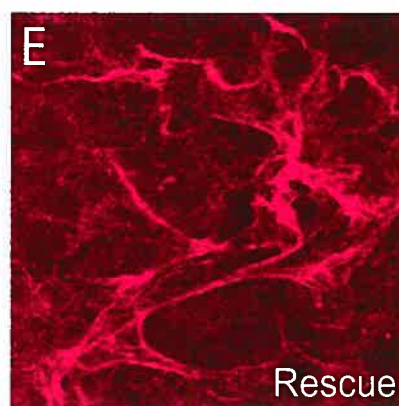
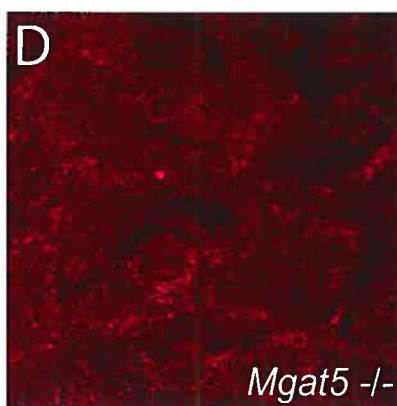
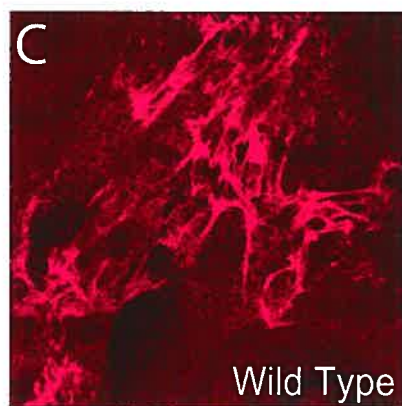
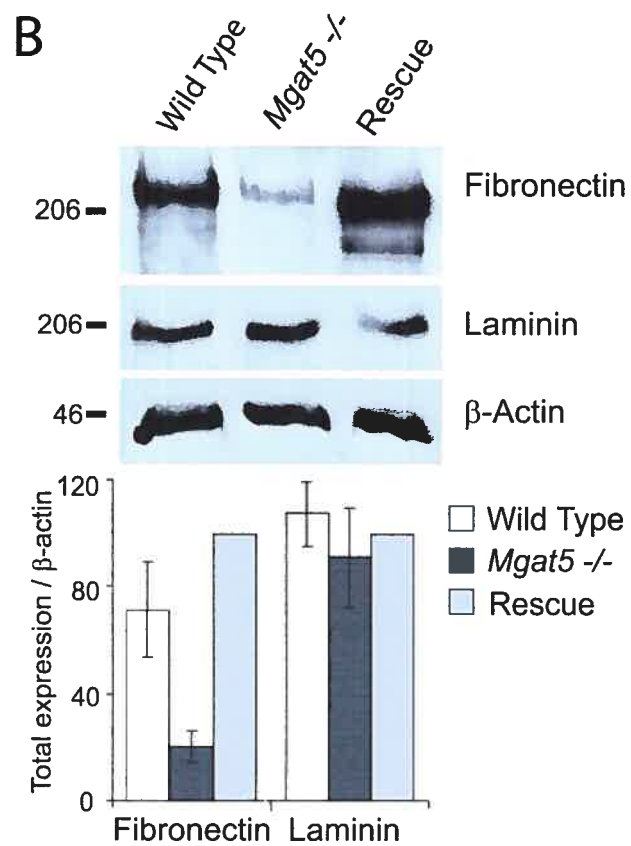
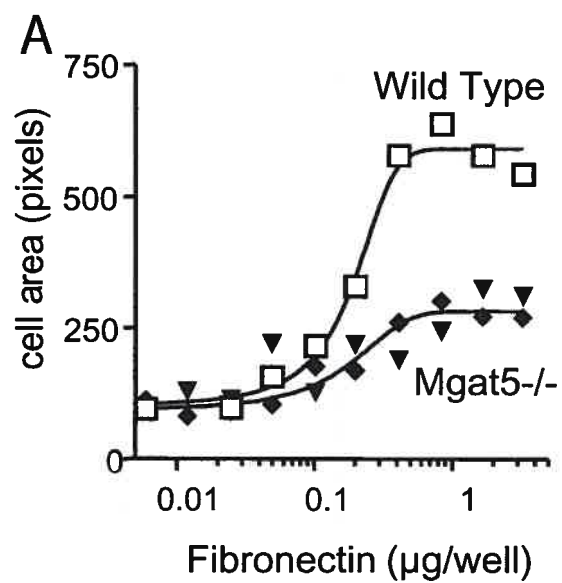


Figure 2: Galectin-3 binding to branching β -1-6 N-glycans regulates FN fibrillogenesis. Wild Type (WT) (A, D, E), *Mgat5*^{-/-} (B) and *Mgat5* rescued (C) cells were plated for 2 days on cover slips coated with 10 μ g/ml of FN in serum-free medium (A-C) supplemented with 1 μ g/ml swainsonine (D) or 20 mM β -lactose (E). Cells were fixed and FN labeled with mouse anti-FN mAb and Alexa-488 conjugated antibodies (green) and actin with Texas-red phalloidin (red). FN fibril intensity was quantified from 10 images of each condition, as indicated (F; \pm SEM; n=4; *p<0.01 relative to control condition of wild type cells). Alternatively, wild-type cells were plated on an FN substrate in serum-free medium in the absence (G) or presence of 1 μ g/ml recombinant galectin-3 (H) and labeled for FN (green) and phalloidin (red). FN fibril intensity was quantified from 10 images of wild type and *Mgat5*^{-/-} cells plated in serum-free medium supplemented with 0, 0.5, 1, 2 and 5 μ g/ml recombinant galectin-3 (I; \pm SEM; n=4).

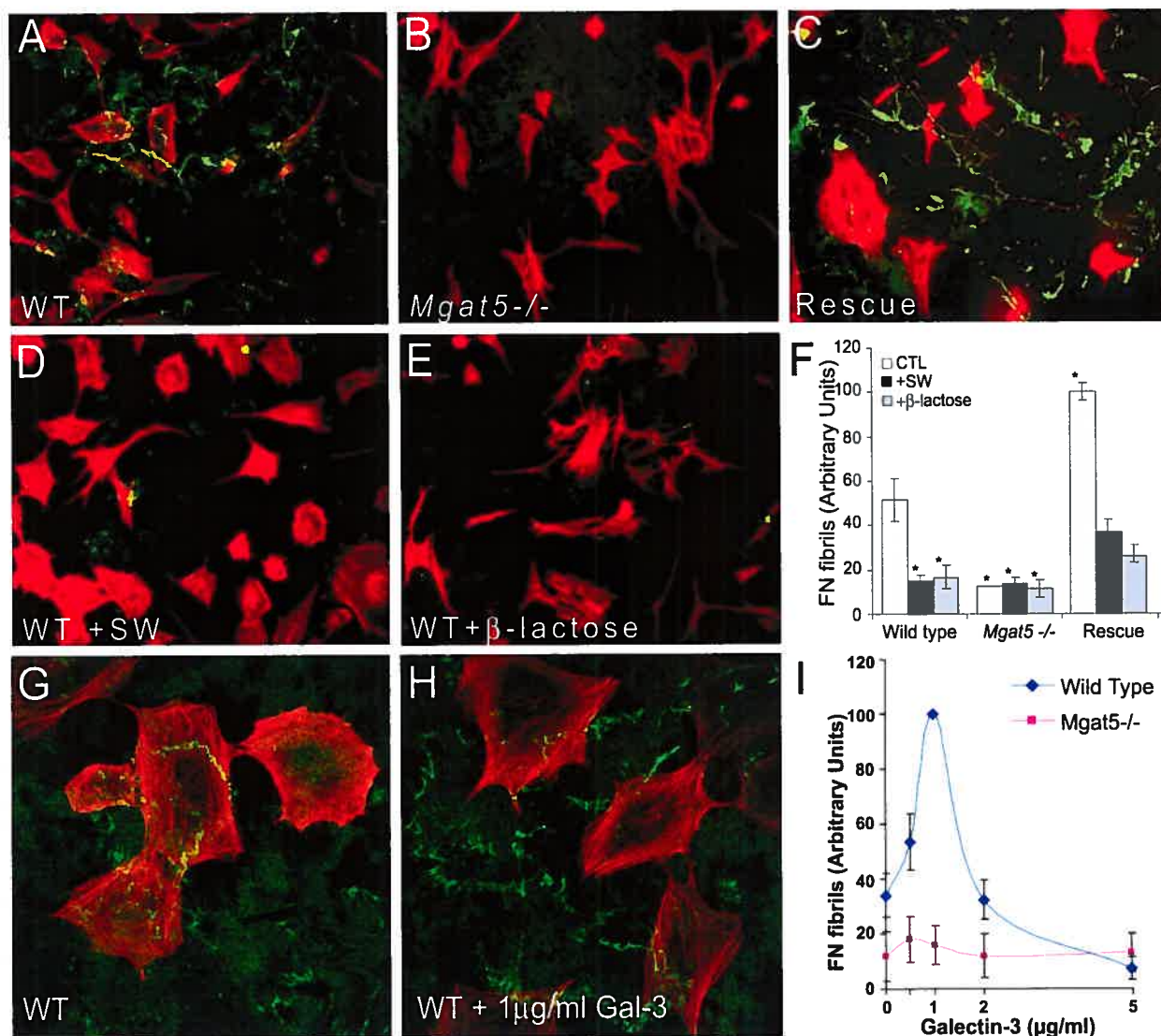


Figure 3: Fibronectin-dependent stimulation of cell motility by galectin-3. Migration of *Mgat5*^{-/-} (A, C) and wild-type (B, D) PyMT tumor cells over a 24 hour period in serum-free medium on an FN substrate (10 µg/ml) in the absence (A, B) or presence (C, D) of 2 µg/ml galectin-3 was determined using a wound healing assay. The dashed line indicates the location of the wound. The distance migrated from the wound of the 10 most motile cells was measured in 4 fields for cells plated on plastic or on an FN substrate in the presence of 0, 1, 2, 3 or 5 µg/ml galectin-3 (E; ±SEM; n=5; *p<0.01 relative to the wild type cells on fibronectin in the absence of added galectin-3).

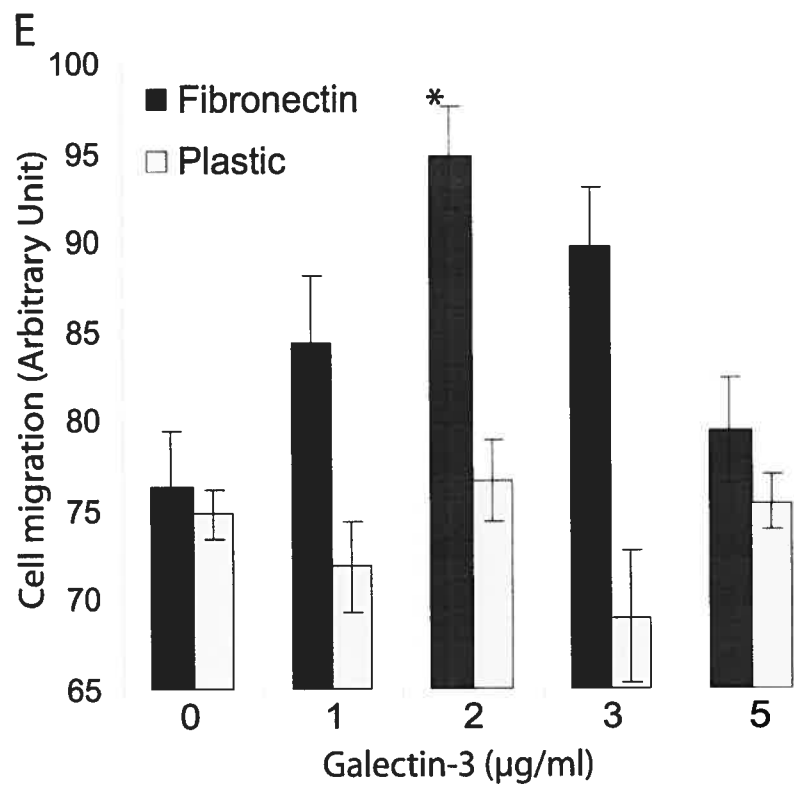
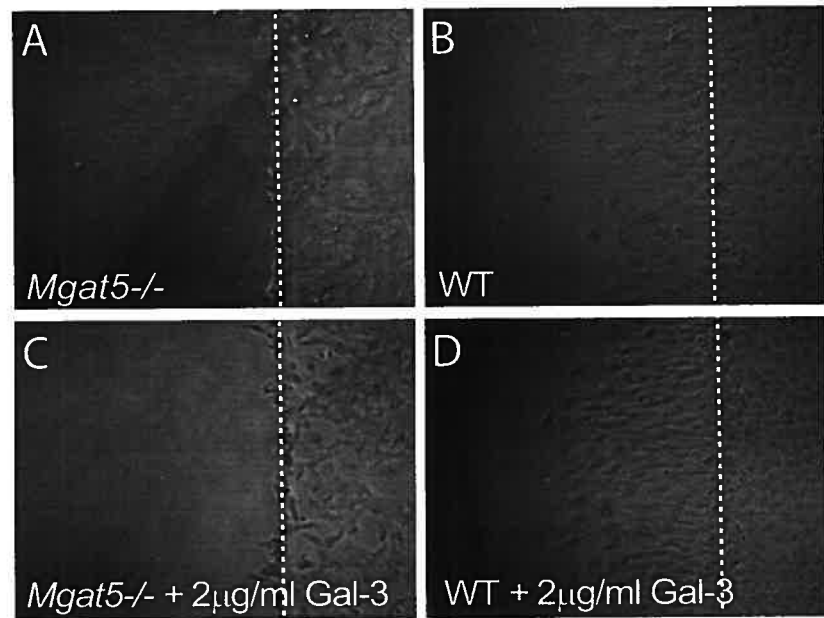


Figure 4: Disruption of RGD-mediated integrin binding enhances galectin-3 stimulation of FN fibrillogenesis and cell motility. Total cell lysates, $\beta 1$ -integrin immunoprecipitates and L-PHA-agarose binding fractions from wild type, *Mgat5*^{-/-} and *Mgat5* rescued cells were blotted with either anti- $\beta 1$ -integrin antibodies, L-PHA-HRP or anti-FN antibodies, as indicated (A). In *Mgat5*^{-/-} cells, $\beta 1$ -integrin migrates more rapidly in SDS-PAGE (* indicates background band in anti- $\beta 1$ IP) and is not recognized by the $\beta 1$ -6 branched N-glycan specific lectin L-PHA. FN also carries L-PHA labeled $\beta 1$ -6 branched N-glycans (A; bottom panel). To determine whether exogenous FN carries $\beta 1$ -6 branched galectin binding sites, 1 μ g of commercial fibronectin was blotted with anti-FN antibody or L-PHA-HRP, as indicated (B). Commercial FN was not recognized by L-PHA. To test whether integrin-FN binding regulates galectin-3 induced fibrillogenesis, wild type cells were plated for 2 days on glass cover slips coated with 10 μ g/ml of FN in serum free medium unsupplemented (C) or supplemented with 100 μ g/ml RGD (D), 1 μ g/ml galectin-3 (E) or 100 μ g/ml RGD and 1 μ g/ml galectin-3 (F) and labeled for fibronectin (green) and F-actin (red). Under the same conditions, FN fibril intensity (G; 10 images per condition; n=4; *p<0.01) and cell migration (H; migration of 10 most motile cells from 4 frames for each conditions; n=5; *p<0.01 relative to CTL).

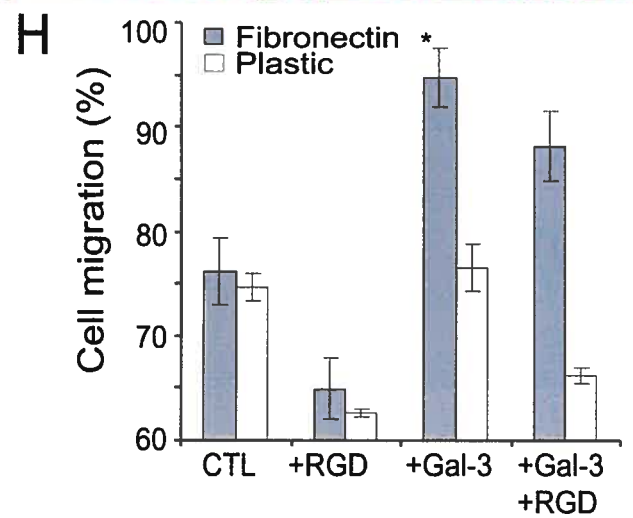
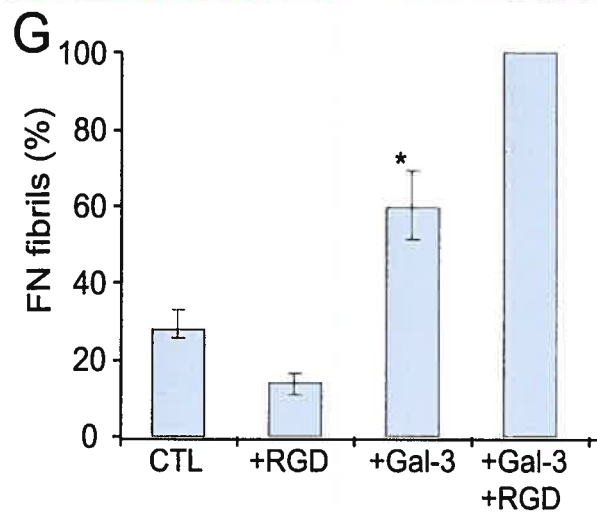
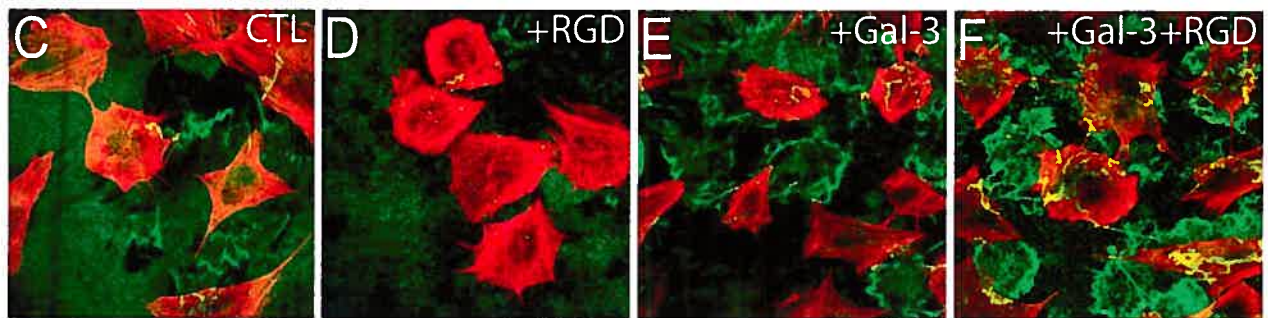
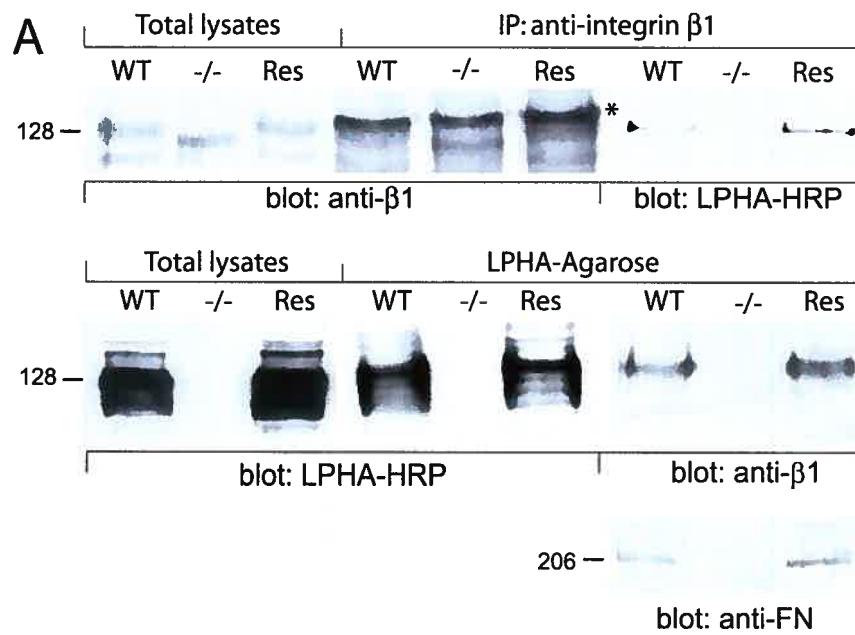
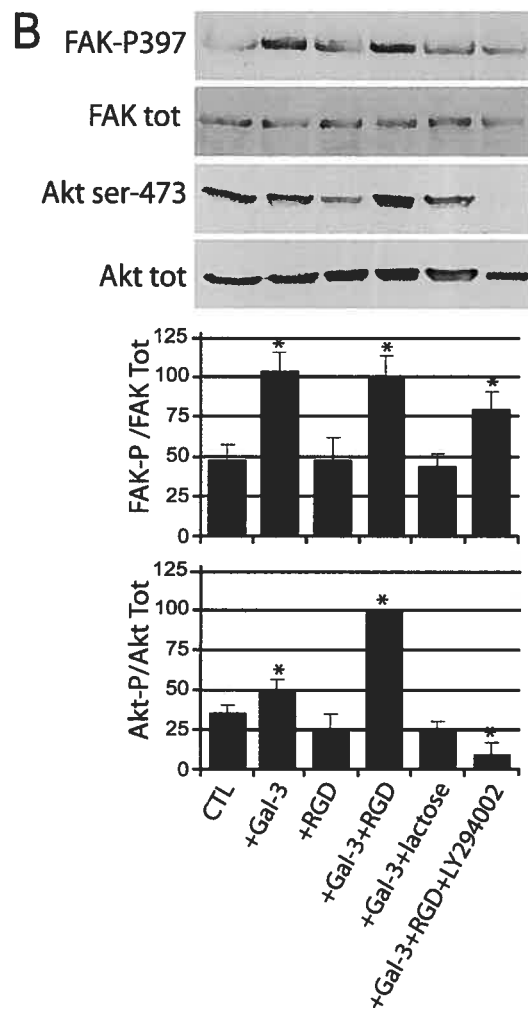
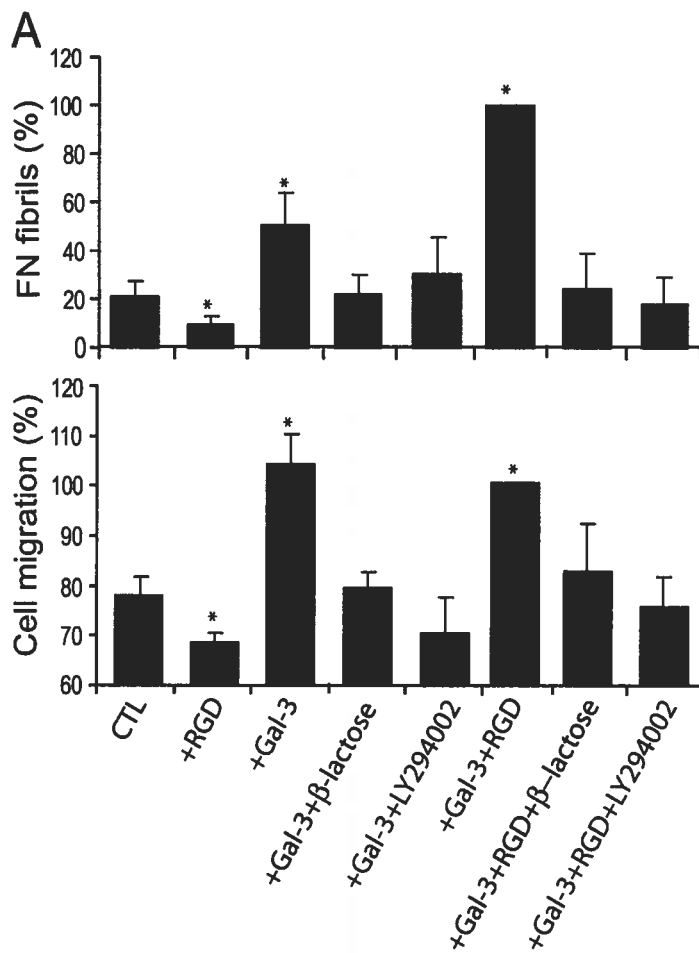
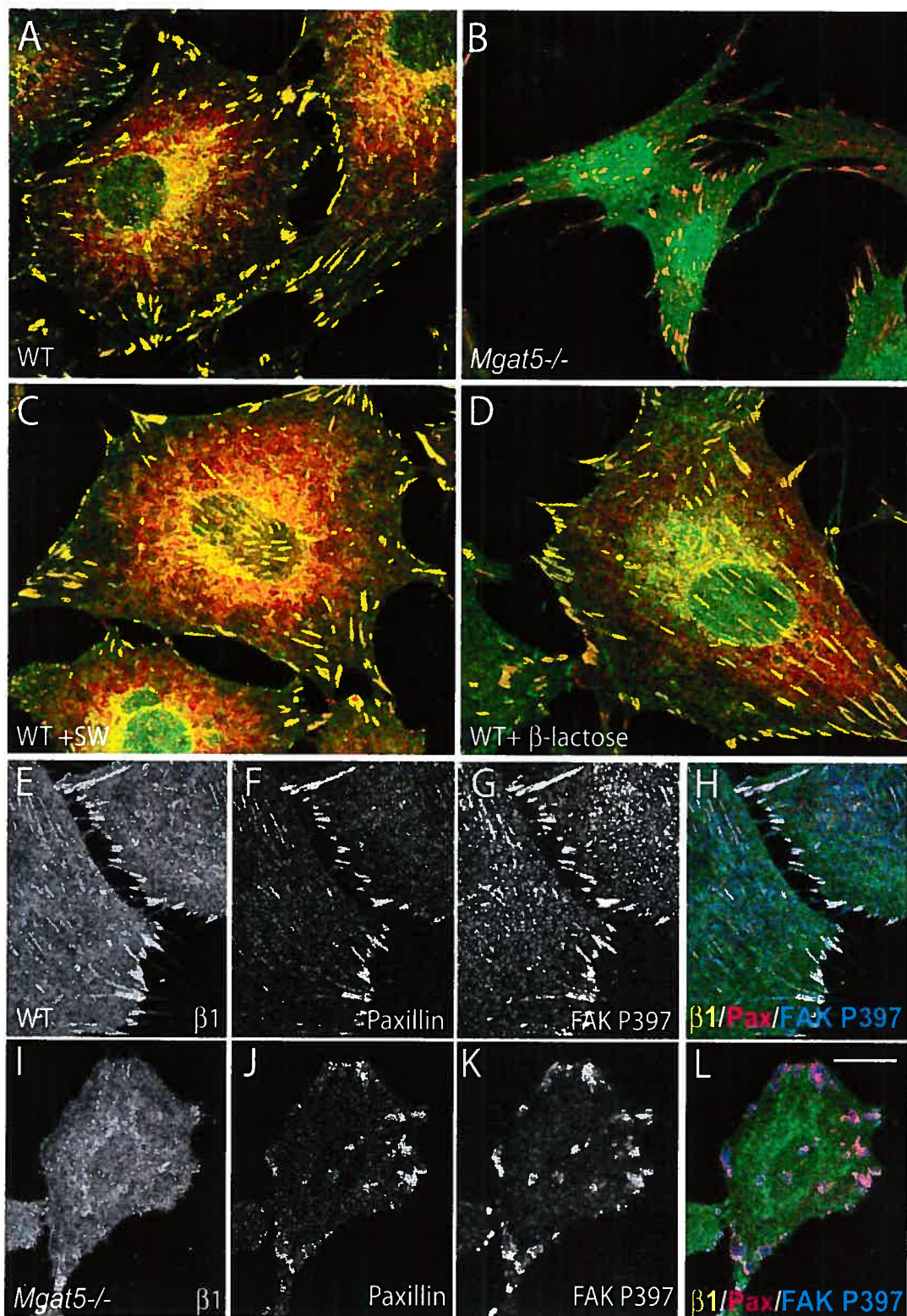


Figure 5: FAK and Akt activation regulate galectin-3 mediated fibronectin matrix remodelling and cell migration. FN fibrillogenesis (top) and cell migration (bottom) was measured in wild type cells plated for 2 days on an FN-coated substrate in serum-free medium supplemented with 100 $\mu\text{g/ml}$ RGD, 1 $\mu\text{g/ml}$ galectin-3, or RGD and galectin-3 in the absence or presence of 20 mM β -lactose or 50 μM LY294002, as indicated (A). The effect of galectin-3 and/or RGD on FAK and Akt activation was studied by western blotting of total wild type cell lysates with anti-FAK-P397, anti-FAK, anti-Akt-ser-473 and anti-Akt antibodies (B). Phosphorylated and total forms of FAK and Akt were blotted on corresponding antibody-stripped nitrocellulose membrane to determine relative activation in the same samples. The graphs show the densitometric quantification of FAK-P relative to total FAK and Akt-ser-473 relative to total Akt ($n=3$; $\pm\text{SEM}$; $*p < 0.01$ relative to CTL).



Supplementary figure: Mgat5 deletion affects β 1 integrin localisation into focal contacts. Wild Type (A, C, D, E-H), *Mgat5*^{-/-} (B, I-L) cells plated for 2 days on glass cover slips coated with 10 μ g/ml of FN in serum free medium in presence of 1 μ g/ml of swainsonine (C) and 20 mM β -lactose (D) were fixed with 3% paraformaldehyde. Integrin β 1 was labeled with rat anti-integrin β 1 mAb and FITC conjugated anti-rat antibodies, paxillin with mouse anti-paxillin mAb and Alexa-568 conjugated secondary antibodies and phosphorylated form of FAK P397 was labeled with rabbit anti- FAK P397 mAb and Alexa-647 conjugated secondary antibodies. Integrin β 1 appears in green (A-D) and in gray (E, I), paxillin in red (A-D) and in gray (E- J). The merge between integrin and paxillin appears in yellow (A-D) and between integrin, paxillin and FAK P397 in white (H, L). Bar: 10 μ m, Integrin β 1 is localised into the focal contacts in the wild type cells but not in the *Mgat5*^{-/-} cells and the swainsonine and β -lactose treatments do not affect the integrin β 1 localisation of wild Type cell.



DISCUSSION

1. L'AMF/PGI

1.1 Les voies non classiques de sécrétion des protéines

La sécrétion des protéines cytosoliques nécessite généralement la présence d'un peptide signal de sécrétion, du côté N-terminal, impliqué dans le ciblage des protéines depuis le RE et l'appareil de Golgi vers la surface cellulaire (Walter, Gilmore et al. 1984; Mellman and Warren 2000). Cette voie dépendante du RE/Golgi est la voie dite "classique" de sécrétion des protéines.

Certaines protéines ne possèdent pas de peptide signal de sécrétion et sont sécrétées en suivant des voies non conventionnelles diverses (Nickel 2003). C'est le cas, entre autre, de l'AMF et de la galectine-3 (Niinaka, Paku et al. 1998; Hughes 1999).

1.1.1 La sécrétion de l'AMF/PGI

La PGI est une enzyme ubiquitaire clé de la glycolyse, impliquée dans l'isomérisation du D-glucose-6-phosphate en D-fructose-6-phosphate. La transformation cellulaire est associée à la surexpression et à la sécrétion de la PGI, qui une fois dans le milieu extracellulaire, devient le facteur de motilité autocrine, l'AMF (Liotta, Mandler et al. 1986; Watanabe, Takehana et al. 1996; Niinaka, Paku et al. 1998), une cytokine capable non seulement de stimuler la motilité et la croissance des cellules mais aussi d'induire l'expression de métalloprotéases, de favoriser l'angiogenèse des cellules endothéliales de façon paracrine et de réguler l'apoptose (Silletti, Watanabe et al. 1991; Silletti, Paku et al. 1996; Funasaka, Haga et al. 2001; Torimura, Ueno et al. 2001; Haga, Funasaka et al. 2003; Yu, Liao et al.

2004). L'AMF/PGI est donc un facteur très important dans le processus métastatique.

L'AMF/PGI ne possède pas de peptide signal de sécrétion et les mécanismes qui régulent sa sécrétion ne sont pas compris (Niinaka, Paku et al. 1998). La sécrétion de l'AMF semble être indépendante d'une mutation ou d'un épissage alternatif de la protéine car la séquence d'ADNc de la protéine cytosolique est la même que celle de la protéine sécrétée (Niinaka, Paku et al. 1998). Par contre, elle semble dépendre de la surexpression de la protéine, de la transformation des cellules et de l'activité d'une protéine caséine kinase II qui phosphoryle l'AMF sur la sérine 185 (Liotta, Mandler et al. 1986; Niinaka, Paku et al. 1998; Haga, Niinaka et al. 2000). La surexpression ectopique de l'AMF dans les cellules NIH-3T3 induit la transformation des cellules et la sécrétion de l'AMF (Tsutsumi, Gupta et al. 2003).

Nous avons généré une protéine de fusion de l'AMF/PGI en ajoutant un *étiquette* HA, codant pour trois copies des 10 acides aminés de l'hémagglutinine, du côté 3' de l'ADNc de l'AMF/PGI humaine (GenBank accession no. KO3515) (Niinaka, Paku et al. 1998). L'AMF/PGI-HA a été insérée dans un vecteur de forte expression pCDNA3/RSV et exprimée de façon transitoire dans les cellules Cos. Cette étude a constitué la première étude de la surexpression de l'AMF-étiquetée dans des cellules de mammifère. Elle a permis d'effectuer une évaluation du rapport entre l'expression de la PGI cytosolique et sa sécrétion.

L'expression cellulaire de l'AMF/PGI-HA était entièrement cytosolique. L'étude du milieu conditionné, sur une période de 16 heures, a montré que 0.1 à 1% de la quantité totale de l'AMF/PGI-HA exprimée par les cellules Cos était sécrétée. Cette quantité pourrait paraître insuffisante pour stimuler la motilité des cellules. Toutefois, des études, effectuées à partir du milieu conditionné de cellules

transfectées avec l'ADNc codant pour l'AMF, ont montré qu'une très faible quantité d'AMF, de l'ordre du nanogramme et même du picogramme, était suffisante pour stimuler la motilité et la croissance des cellules (Haga, Niinaka et al. 2000; Funasaka, Haga et al. 2001). La PGI, en tant qu'enzyme glycolytique, est une protéine très fortement exprimée dans la cellule (ter Kuile 1999). Donc il est possible que 1% de la quantité totale d'AMF/PGI-HA exprimée par les cellules Cos soit une quantité d'AMF acceptable pour avoir une activité cytokine. Il serait intéressant de déterminer qu'elle est la quantité d'AMF sécrétée par les cellules tumorales *in vivo*. Est-ce que cette quantité augmente avec le degré de transformation des cellules? La sécrétion de la PGI par les cellules tumorales est un mécanisme crucial dans la tumorigénicité des cellules. Une meilleure compréhension des mécanismes qui la régulent pourrait permettre de la contrôler.

1.1.1 L'expression de l'AMF/PGI-HA.

Le groupe du Dr Avraham Raz a montré que la surexpression de l'AMF dans les cellules NIH-3T3 transfectées de façon stable induisait la sécrétion de l'AMF et rendait les cellules plus motiles (Tsutsumi, Hogan et al. 2003). Une autre étude utilisant deux types de cellules tumorales, des cellules de fibrosarcome qui expriment l'AMF-R et des cellules d'ostéosarcome qui ne l'expriment pas, a montré que l'expression de l'AMF-R était cruciale pour la stimulation de la motilité par l'AMF (Yanagawa, Watanabe et al. 2004). Ils ont observé que la surexpression de l'AMF induisait sa sécrétion dans le milieu de culture des deux types cellulaires. Toutefois, seules les cellules de fibrosarcome, qui exprimaient l'AMF-R, devenaient plus motiles et métastatiques. Les cellules d'ostéosarcomes qui n'exprimaient pas l'AMF-

R n'avaient pas d'augmentation de leur motilité cellulaire. La stimulation autocrine de la motilité induite par l'AMF dépend donc de l'expression de son récepteur l'AMF-R et pas seulement de la simple surexpression de l'AMF.

Ces résultats appuient l'idée que la sécrétion de la PGI est un élément important de la progression tumorale. Toutefois, certaines cellules normales peuvent également sécréter l'AMF/PGI/NLK/MF. Les cellules T stimulées par des lectines sécrètent la NLK qui induit la maturation des cellules B en cellules sécrétrices d'anticorps (Gurney, Apatoff et al. 1986; Gurney, Apatoff et al. 1986). L'AMF sécrétée agit de façon autocrine mais il peut également agir de façon paracrine sur les cellules normales en tant que cytokine (Le, Benlimame et al. 2000), facteur angiogénique (Funasaka, Haga et al. 2001) mais aussi en tant que NLK ou MF (Xu and Chiao 1996; Chiao, Xu et al. 1999), et son activité reste, là encore, limitée par l'expression de son récepteur (Leclerc, Vallée et al. 2000).

1.2 Autres protéines sécrétées par la voie non classique et associées au cancer

La PGI n'est pas la seule enzyme glycolitique à être surexprimée et sécrétée par les cellules tumorales. L'augmentation de la glycolyse aérobie et anaérobie a souvent été associée à la progression tumorale (Mathupala, Rempel et al. 1997; Gatenby and Gillies 2004; Zu and Guppy 2004). La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6P-DH) et la lactate déshydrogénase (LDH) (une enzyme glycolitique anaérobie impliquée dans la conversion du lactate en pyruvate) sont toutes deux surexprimées par les cellules tumorales et fortement exprimées dans le sérum de patients atteints du cancer (Nagy and Macleod 1979; Szeinfeld 1989; Dimopoulos, Barlogie et al. 1991 ; Merlini, Perfetti et al. 1993; Koukourakis,

Giatromanolaki et al. 2003; Jurisic, Konjevic et al. 2004). L'expression de la LDH dans le sérum, pourrait être utilisée comme outil de pronostique pour la détection des *non-Hodgkin's lymphoma* et de la faible chance de survie des patients atteint du cancer du poumon (Jurisic, Konjevic et al. 2004; Turna, Solak et al. 2004). L'HIF-1, un facteur de transcription qui est exprimé par les tumeurs en état d'hypoxie, augmente l'expression de la PGI et de la LDH (Yoon, Buchler et al. 2001; Koukourakis, Giatromanolaki et al. 2003; Welsh and Powis 2003). Cette augmentation du métabolisme permettrait aux cellules tumorales de résister à l'hypoxie et à l'acidification qui se développent dans les tumeurs et favoriserait la prolifération et l'invasion des cellules (Beckner, Stracke et al. 1990; Welsh and Powis 2003; Gatenby and Gillies 2004).

1.2.1 Le FGF

Le FGF est un facteur angiogénique qui se rapproche de l'AMF par le peu de compréhension qui entoure son mode de sécrétion (Mignatti, Morimoto et al. 1992; Nugent and Iozzo 2000, Burgess, et al. 1989; Tsutsumi, Hogan et al. 2003). Il a été proposé que les facteurs angiogéniques pouvaient être libérés à la suite de blessures mécaniques du tissu ou d'une nécrose due à l'hypoxie dans le cas des tumeurs (McNeil, Muthukrishnan et al. 1989). L'hypoxie favorise l'expression de l'AMF (Yoon, Buchler et al. 2001). Des études ont montré que le FGF était sécrété dans le milieu de culture sans que sa sécrétion soit associée avec une augmentation de la mort cellulaire (Mignatti, Morimoto et al. 1992; Florkiewicz, Majack et al. 1995). Les études en western blot ont montré que le poids moléculaire de l'AMF/PGI-HA sécrétée était un peu différent de celui de l'AMF/PGI-HA cytosolique, ce qui suggère

que la sécrétion de l'AMF n'est pas passive et que l'AMF doit subir des modifications post-traductionnelles avant d'être sécrétée (Niinaka, Paku et al. 1998). Toutefois il serait intéressant de vérifier si la libération de l'AMF dans le milieu extracellulaire est accompagnée d'une augmentation de la mort des cellules.

La conformation de l'AMF pourrait réguler sa sécrétion. La sécrétion de FGF semble dépendre d'un résidu cystéine, la cys30, qui est impliqué dans la *dimérisation* de FGF, sa forme active (Tarantini, Gamble et al. 1995). La mutation de ce résidu empêche la dimérisation et la sécrétion de FGF. La conformation dimérique de la PGI est indispensable à son activité glycolytique et l'AMF active son récepteur lorsqu'elle est sous forme de dimère et de tétramère (Sun, Chou et al. 1999; Amraei and Nabi 2002). Une mutation ponctuelle dans la séquence de l'AMF, qui l'empêcherait de former des dimères et des tétramères, nous permettrait de déterminer si la conformation de l'AMF détermine sa sécrétion. Toutefois, la NLK qui est sécrétée par les cellules neuronales semble être active sous la forme de monomère (Mizrachi 1989). Il serait intéressant de comparer la sécrétion de la PGI dans les fibroblastes transformés à celle des cellules neuronales. L'acidification du milieu de culture réduit l'AMF à sa forme monomérique et cette conformation est reliée à son association directe avec la matrice de FN (Amraei and Nabi 2002). Une protéine recombinante de l'AMF qui resterait sous forme de monomère nous permettrait également d'approfondir les études de l'association de l'AMF avec la FN dans des conditions plus physiologiques (voir section 2.3.3).

1.2.2 La sécrétion des galectines

Les galectines suivent, elles aussi, une voie de sécrétion différente de la voie ER/Golgi (Hughes 1999). Les galectines sont synthétisées par des ribosomes libres

dans le cytoplasme sans peptide signal de sécrétion (Couraud, Casentini-Borocz et al. 1989; Wilson, Firth et al. 1989; Menon and Hughes 1999) et leur sécrétion ne semble pas être affectée par l'utilisation de la Brefendin-A et de la monensine qui sont des inhibiteurs de la voie "classique" de sécrétion (Lindstedt, Apodaca et al. 1993; Sato, Burdett et al. 1993; Hughes 1999).

Les galectine-1 et 3 s'accumulent sous la membrane et sont exportées par des vésicules liées à la membrane plasmique, les exosomes, qui bourgeonnent vers l'extérieur de la cellule où ils libèrent leur contenu (Cooper and Barondes 1990; Sato, Burdett et al. 1993; Mehul and Hughes 1997; Hughes 1999). La partie N-terminale de la protéine est impliquée dans ces mécanismes (Gong, Honjo et al. 1999; Menon and Hughes 1999). La délétion des 120 premiers acides aminés de la protéine empêche sa sécrétion, par contre, l'addition de ce segment à la partie N-terminale d'une protéine cytosolique n'est pas suffisante pour induire sa sécrétion (Gong, Honjo et al. 1999; Menon and Hughes 1999). Donc la partie N-terminale de la protéine n'est pas le seul déterminant à être impliqué dans la sécrétion de la protéine et aucune donnée n'explique comment la protéine est ciblée et concentrée sous la membrane (Menon and Hughes 1999).

1.3 Les implications pour la sécrétion de l'AMF

La comparaison de la séquence des gènes de la PGI/AMF/NLK/MF et les études cristallographiques ont montré que le domaine enzymatique de la PGI, qui est situé dans un domaine central à l'interface entre les deux dimères de la protéine, était très conservé entre les espèces depuis *les bactéries* jusqu'aux *mammifères* (Sun, Chou et al. 1999; Arsenieva, Hardre et al. 2002; Tanaka, Haga et al. 2002). Des différences entre la séquence de la PGI de *bactérie* (*Bacillus*

represent a pathological exaggeration of a normal biological process, the acid-mediated sequestration of cytokines by the extracellular matrix (ECM). However, in spite of the well-characterized ability of ECM-associated proteoglycans, such as heparin, to sequester cytokines (Ruoslahti et al., 1992; Vlodavsky et al., 1996) alternate mechanisms by which the ECM sequesters cytokines remain poorly defined.

The PGI/AMF receptor, gp78 or AMFR, is a seven-transmembrane domain G protein-coupled receptor recently identified as an endoplasmic reticulum (ER)-associated RING finger-protein ligase (Fang et al., 2001; Registre et al., 2004; Shimizu et al., 1999). AMFR internalizes its ligand via both caveolae/raft-dependent endocytosis to the smooth ER and clathrin-dependent endocytosis to multivesicular bodies (Benlimame et al., 1998; Le et al., 2000; Le et al., 2002; Le and Nabi, 2003; Nabi and Le, 2003). The clathrin-dependent pathway has been shown to be associated with the recycling of AMF/PGI and its receptor to cell surface FN fibrils (Le et al., 2000). The ability of PGI/AMF to associate directly with FN at acid pH (Amraei et al., 2003) and indirectly following receptor-mediated recycling at neutral pH (Le et al., 2000) led us to address the specificity and mechanisms of PGI/AMF association with FN fibrils at neutral and acid pH.

We show here that PGI/AMF interacts specifically with FN in its fibrillar form at both neutral and acid pH. Fluorescent resonance energy transfer (FRET) was however detected between PGI/AMF and FN only at acid pH, representing the first demonstration of FRET between FN and an interacting protein and indicative of a direct interaction between these two proteins at acid pH. Heparan sulphate (HS) has been shown to mediate cytokine binding to FN but PGI/AMF association with the cell surface at neutral pH is not affected by the addition of HS. At acid pH, PGI/AMF

binding exhibits a dose-dependent increase in cell surface binding in the presence of HS that is not specific for FN fibrils and occurs even in the absence of FN expression identifying two distinct mechanisms for PGI/AMF sequestration at acid pH. At neutral pH, the indirect interaction of PGI/AMF with FN is receptor-mediated and serves to sequester recycling PGI/AMF. Multiple mechanisms therefore mediate the cell surface interactions of PGI/AMF.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and reagents

Rabbit phosphoglucose isomerase (Sigma P-9544; referred to as PGI/AMF), poly-L-lysine, bovine plasmatic FN, bovine serum albumin solution (BSA 30%), and heparan sulphate proteoglycan were purchased from Sigma Chemical Co. (Oakville, ON). Monoclonal anti-FN antibody was purchased from Transduction Laboratories (Mississauga, ON). Streptavidin conjugated to either Texas Red or fluorescein was purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Mouse anti-hemagglutinin (HA) was a gift from Luc Desgroseillers (Department of Biochemistry, Université de Montréal). Monoclonal Anti-T7 tag antibody was purchased from Novagen. Texas-Red conjugated phalloidin, Alexa-488 goat anti-mouse, Alexa-568 goat anti-mouse, and Alexa-647 goat anti-rabbit secondary antibodies were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Human FN-FITC was a gift from Deane Mosher (University of Wisconsin, Madison, WI). The Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 568 and the FluoReporter® FITC Protein Labeling Kits were purchased from Molecular Probes (Eugene, Oregon) and used to tag both AMF and bovine FN according to the manufacturer's instructions. PGI/AMF was biotinylated

with long chain N-hydroxyl-succinimido-biotin (Pierce, Rockford, IL) according to the manufacturer's instructions.

Cell Culture

NIH-3T3 fibroblasts obtained from the American Type Culture Collection (1658-CRL) were cloned for these studies (Benlimame et al., 1998). Fibroblasts differentiated from ES cells heterozygous (FN^{+/-}) and homozygous (FN^{-/-}) for the fibronectin (FN) mutation (Saoncella et al., 1999) were obtained from Deane Mosher. The cells were grown in a Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with either 10% calf serum (NIH-3T3) or 10% fetal bovine serum (FBS) (FN^{+/-} and FN^{-/-} fibroblasts), non-essential amino acids, vitamins, glutamine and a penicillin-streptomycin antibiotics (Canadian Life Technologies) at 37°C in a humidified 5% CO₂/95% air incubator. Where indicated, cover slips were coated with FN by incubation with 200 µl of a solution of 10 µg/ml of FN in PBS for 1 hour at room temperature and then washed 3 times with PBS before plating the cells.

Viral Infection

Recombinant adenovirus expressing the tetracycline-regulatable chimeric transcription activator (tTA), HA-tagged wild-type dynamin-1 (dynWT), HA-tagged dominant negative dynamin-1 K44A mutant (dynK44A) and T7-tagged clathrin hub (Cla-hub), under the control of the tetracycline-regulated promoter were used as previously described (Altschuler et al., 1998; Altschuler et al., 1999; Le et al., 2002). To enhance infection rates, viral stocks of tTA, dynWT, dynK44A and Cla-hub, were preincubated with 10 µg/ml of poly-L-lysine for 30 min at room temperature. Infection with only tTA adenovirus was used as a control. NIH-3T3 cells were plated on glass cover slips for 24 hours and rinsed once with PBS before addition of the adenovirus/poly-L-lysine mixture in 2 ml of serum-free medium for 1 hour at 37°C.

After removal of the adenovirus mixture, the cells were rinsed twice with serum-free media and then incubated for 36 hours in regular culture media.

Immunofluorescence labeling

50 000 NIH-3T3, FN^{+/−} and FN^{−/−} fibroblasts were plated on glass cover slips for 2 days before each experiment. For the PGI/AMF internalization studies, cells were pulse labeled with 5 or 25 µg/ml of biotinylated PGI/AMF (bPGI/AMF) or Alexa-568 conjugated PGI/AMF (PGI/AMF-568) in bicarbonate-free, HEPES-supplemented (pH 7.4) complete medium (complete HEPES medium) or in bicarbonate-free, MES-supplemented (pH 5.0) complete medium for the indicated times at 37°C. Where indicated cells were pretreated with 10 µg/ml heparan sulphate proteoglycan for 1 hour, competed with excess (100µg/ml) PGI/AMF, or coincubated with 10 µg/ml fluorescein conjugated fibronectin (FN-FITC). Cells were washed with complete HEPES medium and PBS (pH 7.4) supplemented with 0.1 mM Ca²⁺ and 1 mM Mg²⁺ (PBS-CM) and then fixed with 3% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. After fixation, cells were rinsed extensively with PBS and permeabilized with 0.1 % Triton X-100 in PBS-CM containing 0.5% BSA (PBS-CM/TX/BSA) for 15 min to reduce non-specific binding. All washings and incubations with both primary and secondary antibodies were done with PBS/CM containing 0.2% BSA (PBS-CM/BSA). Postfixation labeling was performed with Texas Red-streptavidin to label bPGI/AMF or with the indicated primary antibodies followed by the appropriate fluorescent secondary antibodies. To follow the recycling of PGI/AMF, NIH-3T3 cells were pulse labeled with 25 µg/ml of bPGI/AMF for 30 minutes at 37°C in complete HEPES medium, washed with complete medium during 10 minutes and then incubated with Texas Red-streptavidin at 37°C or at 4°C for 30 minutes. The cells were washed extensively with complete HEPES medium and PBS-CM before

fixation with 3% paraformaldehyde and permeabilization with PBS-CM/TX/BSA. Intracellular bPGI/AMF was then labeled with FITC-streptavidin for 30 min. After labeling, the cover slips were mounted in Airvol (Air Products Inc, Allentown, PA) and viewed with the 60X Plan Apochromat objective of a BioRad MRC-600 or the 63X Plan Apochromat objective of a Leica TCS-SP1 confocal microscope equipped with 488, 568, and 633 laser lines.

From 8-bit confocal images, acquired with the 63X objective of the Leica TCS SP1 confocal microscope at zoom 1, of cells double labeled for PGI/AMF-568 and FN, cell- and FN-fibril associated fluorescence intensity were quantified using Northern Eclipse software (Empix Imaging, Mississauga, Ontario). For each experiment, using the most intensely labeled PGI/AMF-568 slide, gain and offset were adjusted (glowoverunder) to just below saturation and just above zero intensity, respectively, and all images were subsequently acquired with the same confocal settings. From 10 images per condition, non-cellular regions were cut and total fluorescence intensity of the PGI/AMF-568 label determined. Subsequently, a Boolean AND operation was performed between the PGI/AMF-568 labeled image and the FN image and the fluorescent intensity of only the PGI/AMF-568 positive pixels that overlapped with FN labeled pixels quantified from each image to provide a measure of the PGI/AMF labeling that overlapped with FN fibrils. Presented data represent the average of three independent experiments (\pm SEM) and statistical analyses were performed using the Student t test.

Photobleaching fluorescence resonance energy transfer (FRET)

Photobleaching FRET analysis was performed on fixed cells by measuring donor fluorescence intensity before and after destruction of the acceptor by photobleaching. NIH-3T3 cells were incubated with FN-488 for 30 minutes at pH 7.5

in complete medium and then for 30 minutes with PGI/AMF-568 at pH 7.5 or at pH 5 in bicarbonate-free medium at 37°C. Incubations with only FN-488 or PGI/AMF-568 or with FN-488 and FN-568 at pH 7.5 served as controls. Cells were washed with PBS/CM and fixed with 3% paraformaldehyde and the cover slips were mounted in Airvol. Images were collected and analysed on a Leica TCS-SP1 confocal microscope (Leica Microsystems, Germany) equipped with a 63 X Plan Achromat objective, an argon laser for 488 nm excitation, a krypton laser for 568 nm excitation and data analysis software to quantify the intensity of the fluorescence.

The measured FRET efficiency was calculated using the technique of acceptor photo-bleaching. First, single scan images at zoom 1X of donor (Alexa-488) and acceptor (Alexa-568) were collected with a pinhole of 1 Airy unit. Then, the acceptor was bleached in the zone of interest with the Krypton 568 laser at high intensity for 20 frames over 32s 395ms such that the acceptor was photo-bleached by 60% to 90%. New single scan images at zoom 1X were then acquired simultaneously for both the donor and the acceptor. The sample was not bleached to 100% to avoid oxidation of the sample and bleaching of the donor. Donor and acceptor fluorescence intensity in the bleached window were quantified before and after bleaching of the acceptor. Percentage FRET and bleach efficiency were calculated from donor or acceptor fluorescence intensity measured before and after photobleaching of the acceptor according to the equation $\{\%FRET = (D_{after} - D_{before})/D_{after}\}$ where D_{before} and D_{after} represent the emitted intensity of the donor or acceptor fluorescence collected specifically in the bleach region before and after the photobleaching, respectively (Kenworthy, 2001; Wouters et al., 2001).

RESULTS

Specific interaction of PGI/AMF with cell surface fibronectin fibrils

Previous data showed that incubation of NIH-3T3 cells with PGI/AMF results in its internalization via clathrin-coated vesicles to a multivesicular body (MVB) and subsequent recycling to the cell surface where it associates with FN fibrils (Le et al., 2000). To determine the specificity of PGI/AMF-FN interaction, we studied PGI/AMF endocytosis and recycling in FN^{-/-} fibroblasts. Compared to heterozygous FN^{+/-} fibroblasts, FN homozygous mutated FN^{-/-} fibroblasts do not express FN fibrils on the cell surface (Figure 1). Some FN did associate with the cells, apparently from FN present in the serum, but did not form fibrils. Following a 30 minute pulse with PGI/AMF conjugated with Alexa 568 (PGI/AMF-568), internalized PGI/AMF-568 is localized to punctate vesicular structures corresponding to MVBs (Le et al., 2000) in both cell types. However, a fibrillar distribution of PGI/AMF was observed only in the FN^{+/-} cells where it colocalized with cell surface FN fibrils (Figure 1 A-C). Recent studies have shown that PGI/AMF can associate directly with FN fibrils at acid pH (Amraei et al., 2003). Similarly, PGI/AMF exhibited increased association with FN fibrils of FN^{+/-} cells at pH 5 (Figure 1, G-I). However, for FN^{-/-} cells, endocytosis is blocked by acid pH and a fibrillar association of PGI/AMF was not observed (Figure 1 J-L) at either neutral or acid pH. The cell surface fibrillar association of PGI/AMF is therefore highly specific for FN expression at neutral and acid pH.

To assess whether PGI/AMF specifically interacts with fibrillar forms of FN, we plated NIH-3T3 cells on dimeric FN coated cover slips. After 48 hours culture, both an elaborate fibrillar network of FN as well as substrate-associated dimeric FN are visualized (Figure 2). After incubation with 25 µg/ml of bPGI/AMF for 60 minutes at pH 7.5, confocal images show that bPGI/AMF is incorporated into MVBs and

colocalizes with FN fibrils but is not associated with the dimeric non-fibrillar FN substrate (Figure 2).

Two distinct mechanisms of PGI/AMF sequestration at acid pH

In order to determine the nature of the association between PGI/AMF and FN at both neutral and acid pH, we performed FRET analysis by acceptor photobleaching of NIH-3T3 cells incubated for 60 minutes with PGI/AMF-568 and FN-488 at either pH 5 or pH 7.5 (Figure 3). While a FRET efficiency of $\sim 14.6 \pm 1.5$ % was detected for interaction between PGI/AMF-568 and FN-488 at pH 5, essentially no energy transfer was detected at pH 7.5. The efficiency of transfer between PGI/AMF-568 and FN-488 at pH 5 was significant and corresponded to that obtained between FN-568 and FN-488. No transfer was observed in the absence of acceptor or donor indicating that the energy transfer is specific. The Förster radius for Alexa488 and Alexa568, defining the distance at which energy transfer is 50% efficient, is 62 Å (Molecular Probes website). At pH 5, PGI/AMF and FN are therefore in close proximity and likely directly interacting. The lack of energy transfer at pH 7.5 indicates that at neutral pH interaction between PGI/AMF and FN is not direct.

HS is implicated in ECM-mediated sequestration of multiple cytokines (Vlodavsky et al., 1996) and has been shown to bind specifically to matricryptic sites in FN (Homandberg et al., 1985). To determine if HS is involved in the association of PGI/AMF with the FN fibrils, NIH-3T3 cells were pretreated with various concentrations of HS (1-100 µg/ml) and then incubated with PGI/AMF-568. At neutral pH, the addition of HS did not affect the total cellular association of PGI/AMF across the range of HS concentrations (Figure 4 A). Specific association of PGI/AMF

with FN fibrils was not affected by the presence of 10 $\mu\text{g/ml}$ HS (Figure 4 B) and preincubation with HS did not influence PGI/AMF endocytosis to MVBs (Figure 4 C-D). However, when NIH-3T3 cells pretreated with HS (at pH 7.5) were incubated with PGI/AMF-568 at pH 5.0, the cellular association of PGI/AMF was increased in a dose-dependent manner with maximal binding at 10 $\mu\text{g/ml}$ HS (Figure 5 A). The increased cellular binding of PGI/AMF in the presence of HS could be competed with an excess of PGI/AMF indicating that this interaction is saturable (Figure 5 B). However, quantification of the overlap of PGI/AMF labeling with FN fibrils showed that specific interaction with FN fibrils was only slightly increased (Figure 5 B) and in the presence of HS PGI/AMF was seen to exhibit a punctate distribution that did not colocalize with FN or FN fibrils (Figure 5 C, D). In $\text{FN}^{-/-}$ cells, HS still stimulated the cell surface association of PGI/AMF-568 at acid pH and the HS-dependent cell surface binding of PGI/AMF was not fibrillar but rather punctate in nature (Figure 6). HS therefore mediates an alternate, FN-independent mechanism for the cell surface association of PGI/AMF at acid pH.

PGI/AMF endocytosis is necessary for its association with FN fibrils on the cell surface

As the indirect interaction of PGI/AMF with FN at neutral pH is evidently not mediated by HS, we undertook to determine the extent to which PGI/AMF association with FN fibrils requires prior receptor-mediated PGI/AMF endocytosis and recycling. NIH-3T3 cells were infected with an adenovirus expressing wild type dynamin (dynWT), the dominant negative form of dynamin (dynK44A) that blocks both clathrin-dependent and the caveolae/raft-dependent endocytosis, or the clathrin hub that blocks specifically clathrin-dependent endocytosis (Altschuler et al., 1998; Altschuler et al., 1999; Le and Nabi, 2003). As expected, infection with dynWT does

not affect the endocytosis and recycling of PGI/AMF-568 (Figure 7). Infection with dynK44A and the clathrin hub do not affect FN fibrillogenesis (Figure 7 F, I, L) but their expression prevents not only PGI/AMF uptake to MVBs but also its association with cell surface fibrils (Figure 7). The clathrin-dependent endocytosis of PGI/AMF is therefore a prerequisite for its association with FN fibrils.

Coincubation of cells with both PGI/AMF and FN allowed us to segregate PGI/AMF internalization from FN fibrillogenesis. After 10 minutes of coincubation, bPGI/AMF is localised essentially exclusively to MVBs, as previously reported (Le et al., 2000), while the vast majority of cell-associated FN is incorporated into fibrils (Figure 8 A-C). After 60 minutes coincubation, bPGI/AMF is localized to MVBs as well as to cell surface FN fibrils. The minimal presence of FN in PGI/AMF-positive MVBs argues that interaction between bPGI/AMF and FN occurs following delivery of PGI/AMF to the cell surface.

If this were the case, we should be able to capture recycling PGI/AMF at the cell surface. NIH-3T3 cells were pulse labeled with bPGI/AMF for 30 minutes and, after a 10 minute wash, incubated with Texas Red streptavidin at either 37°C or 4°C for a further 30 minutes (Figure 9). Following incubation at 4°C, Texas Red streptavidin added to viable cells could be observed to bind only to cell surface fibrillar structures. However, when added to cells at 37°C it was also internalized to intracellular vesicular structures that colocalized with bPGI/AMF labelled after fixation with FITC-streptavidin. In the absence of a prior bPGI/AMF pulse, Texas Red streptavidin was not observed to label the cells. bPGI/AMF that has recycled to the plasma membrane can therefore undergo another round of endocytosis prior to interaction with and sequestration by FN fibrils.

DISCUSSION

Trafficking and FN interaction of PGI/AMF

PGI/AMF activation of its receptor activates a pertussis toxin sensitive G-protein mediated pathway and downstream PKC, PI3-K, MEK and JNK signaling pathways as well as the small GTPases rac and rho (Nabi et al., 1990; Torimura et al., 2001; Tsutsumi et al., 2002). PGI/AMF stimulation induces the rearrangement of focal adhesion proteins and induction of stress fibers as well as the translocation of $\beta 1$ integrins to the cell surface (Timar et al., 1996; Torimura et al., 2001). PGI/AMF stimulates cell adhesion and spreading of metastatic murine melanoma cells (B16a) on a FN substrate (Timar et al., 1996) as well as the incorporation of substrate FN into fibrils in low metastatic K1735-C111 murine melanoma cells and its degradation by high metastatic K1735-M1 cells (Silletti et al., 1998). AMFR activation of downstream effectors, including rho-mediated contractility (Tsutsumi et al., 2002; Zhong et al., 1998), is therefore implicated in ECM reorganization during cell motility.

PGI/AMF is internalized by its receptor via both clathrin- and caveolae/raft-dependent pathways (Benlimame et al., 1998; Le et al., 2000; Le et al., 2002; Le and Nabi, 2003). The clathrin-dependent pathway targets MVBs and we have previously shown that internalized PGI/AMF can recycle to cell surface FN fibrils (Le et al., 2000). The ability of adenoviral infection with both the clathrin hub and dynamin K44A to prevent PGI/AMF association with FN fibrils (Figure 7) shows that clathrin-dependent endocytosis and recycling of PGI/AMF is a prerequisite for its association with FN fibrils. Together with the fact that inhibition of caveolae/raft-dependent endocytosis with m β CD does not prevent fibril association of PGI/AMF (Le et al., 2000), these data show definitively that the caveolae/raft-dependent uptake of

PGI/AMF (Benlimame et al., 1998; Le et al., 2002; Le and Nabi, 2003) does not mediate FN association.

The demonstration that PGI/AMF can recycle from MVBs for more than one cycle argues that upon recycling to the cell surface, the PGI/AMF-AMFR complex does not interact directly with FN but can be reinternalized (see Figure 10). EGF-R is targeted to multivesicular endosomes that mediate its downregulation (Felder et al., 1990; Futter et al., 1996) and EGF-R can signal from endocytic compartments (Pennock and Wang, 2003; Sorkin, 2001). Similarly, the clathrin-dependent PGI/AMF-AMFR recycling pathway via MVBs may be involved in AMFR signaling function. For instance, plating cells on a PGI/AMF coated substrate inhibited cell motility and the clathrin- but not the caveolae/raft-dependent uptake of PGI/AMF (Le et al., 2000). Reduced FN expression has long been associated with transformation and tumor progression (Hynes and Wyke, 1975; Olden and Yamada, 1977) and polymeric or superfibronectin inhibits tumor growth and metastasis (Pasqualini et al., 1996; Yi and Ruoslahti, 2001). Sequestration of recycling PGI/AMF-AMFR complexes by association with FN fibrils may limit the extent of ligand-dependent AMFR signaling. In the absence of FN fibril expression, functional PGI/AMF-AMFR interaction and signaling would be potentiated contributing to tumor cell motility and metastasis.

Coincubation of cells with both PGI/AMF and FN shows clearly that after only ten minutes FN is incorporated into fibrils while PGI/AMF is endocytosed to endosomes. Little to no FN could be detected in PGI/AMF positive MVBs and it is therefore unlikely that this recycling pathway is involved in FN fibrillogenesis. FN fibrillogenesis is a multistep cell-mediated process that invokes conformational

changes in FN structure mediated by $\alpha 5 \beta 1$ integrin and rho-dependent elongation along actin fibres to generate elongated fibrillar structures (Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer, 2003). However, whether integrin endocytosis and recycling (Molnar et al., 1987; Pierini et al., 2000) is involved in fibril initiation and fibrillogenesis is not clear. Adenoviral expression of dynK44A and clathrin hub, inhibiting both caveolae/raft- and clathrin-dependent or only clathrin-dependent endocytosis, respectively, did not affect the extent of FN fibrillogenesis by NIH-3T3 cells indicating that endocytosis is not required for fibril formation.

Acid-specific sequestration of PGI/AMF

Many proteins interact with FN including multiple integrins as well as ECM proteins such as collagen, fibrin, thrombospondin, tissue transglutaminase and proteoglycans. FN undergoes dramatic structural changes upon fibril formation that reveal formerly cryptic protein binding sites (Geiger et al., 2001; Pankov and Yamada, 2002). Matrix assembly and exposure of cryptic motifs is critical for the contractility, adhesion and cell growth properties of FN (Davis et al., 2000; Hocking et al., 2000; Mercurius and Morla, 1998; Sottile and Hocking, 2002). Fibrinogen, thrombospondin-1 and transglutaminase associate specifically with FN fibrils and their incorporation into the ECM is further associated with fibril assembly (Dardik and Lahav, 1999; Pereira et al., 2002; Verderio et al., 1998). The lack of cell surface association of PGI/AMF with FN^{-/-} cells at both neutral and acid pH in the absence of HS indicates clearly that the cell surface fibrillar interaction of PGI/AMF is specific for FN. The selective binding of PGI/AMF to FN fibrils but not soluble FN argues that it interacts with cryptic motifs exposed upon fibril formation.

PGI/AMF is an oligomeric protein whose enzymatic function is dependent on dimer formation (Bruch et al., 1976) and acidification to pH 5 is associated with loss of enzymatic activity due to disruption of PGI/AMF oligomeric structure (Amraei et al., 2003; Dyson and Noltmann, 1968). We have previously shown that the acid-induced association of PGI/AMF with FN is associated with both changes in the tertiary structure of the protein and disruption of the oligomeric structure of the protein (Amraei et al., 2003). The detection of FRET between PGI/AMF and FN at pH 5 indicates that interaction between the proteins is direct and supports a role for the altered conformation of PGI/AMF at acid pH as a mediator of its interaction with FN fibrils. While intramolecular FRET has been described for FN (Baneyx et al., 2001; Baneyx et al., 2002), we are not aware of any studies showing FRET between FN and a FN binding protein. Intermolecular FRET between FN and PGI/AMF at pH 5 therefore demonstrates clearly the direct protein-protein interaction between FN and a cytokine.

Curiously, in spite of the specificity of the cell surface fibrillar binding of PGI/AMF for FN (Figure 1), this interaction is not saturable (Amraei et al., 2003) (Figure 5). Under the conditions used, FN binding sites are evidently not limiting for PGI/AMF binding. PGI/AMF interaction with FN at pH 7.5 is saturable and AMFR associates with FN fibrils in NIH-3T3 cells (Le et al., 2000). The lack of FRET between PGI/AMF and FN and the required role for receptor recycling in PGI/AMF association with FN at neutral pH are consistent with the AMFR-mediated interaction of PGI/AMF with FN. While the precise nature of this interaction remains unclear, distinct mechanisms mediate the interaction of PGI/AMF and FN at neutral and acid pH.

The role of heparan sulphate proteoglycans in the sequestration by the ECM of angiogenic factors, such as VEGF and FGF-2, chemokines, such as interleukin-8 and platelet factor 4, and growth factors, including IGF-I and TGF- α , is well-established (Folkman and Shing, 1992; Ruoslahti et al., 1992; Vlodavsky et al., 1996). Heparin-mediated interaction with the ECM protects cytokines from degradation by matrix metalloproteases and concentrates cytokines for subsequent release upon matrix degradation (Bottaro, 2002; Miao et al., 1996). HS selectively increases cellular PGI/AMF binding at acid and not neutral pH identifying HS as a cellular receptor for PGI/AMF under acidic conditions. Although FN has two defined HS binding sites (Homandberg et al., 1985), the presence of HS does not enhance PGI/AMF binding to FN fibrils and increases PGI/AMF binding to FN^{-/-} cells. HS therefore mediates the FN-independent interaction of PGI/AMF with the cell under acidic conditions. Acid-induced conformational changes of PGI/AMF (Amraei et al., 2003) therefore regulate both its binding to FN fibrils and to HS. Similarly, calcium-dependent conformational changes in thrombospondin mediate its interaction with both FN and heparin (Dardik and Lahav, 1999).

We have therefore identified two acid-specific mechanisms for the sequestration of PGI/AMF: direct interaction with FN fibrils and FN-independent binding to cell surface-associated HS. Hypoxia is associated with local acidification and results in the activation of HIF-1, a transcription factor that induces transcription of genes coding for glycolytic enzymes and angiogenic factors (Dang and Semenza, 1999), including PGI/AMF (Niizeki et al., 2002; Yoon et al., 2001). Increased expression of glycolytic enzymes and glycolysis under hypoxic conditions would therefore result in the increased secretion of PGI/AMF into an acidic milieu. The

specific sequestration of PGI/AMF and other angiogenic cytokines, such as VEGF (Goerges and Nugent, 2003; Goerges and Nugent, 2004), under acidic conditions may serve to concentrate proangiogenic factors at sites of tissue damage in order to promote angiogenesis towards the damaged region upon resolution of the tissue insult.

Multiple pH selective mechanisms therefore exist for the cell surface interaction of PGI/AMF. Recently, insulin-like growth factor binding protein-3 was shown to interact with cell surface PGI/AMF and inhibit its cytokine activity (Mishra et al., 2004). The cytokine function of PGI/AMF is specific for the mammalian and not the bacterial or yeast forms of this conserved glycolytic enzyme and was evidently acquired evolutionarily (Amraei and Nabi, 2002). The PGI/AMF receptor, AMFR, contains RING and CUE domains but a database search for CUE domain-containing proteins could identify only a *C. elegans* homologue for AMFR (Ponting, 2000; Shimizu et al., 1999). Metazoan AMFR was proposed to result from the fusion of a yeast RING finger containing protein and Cue1p, a ubiquitin scaffolding protein (Ponting, 2000) suggestive of the coordinate acquisition of ligand cytokine function and expression of its receptor early during the evolution of multicellular organisms. The multiple cell surface interactions of this ligand and elaborate trafficking of its receptor (Figure 10) may represent acquired mechanisms to regulate and harness the cytokine function of this ubiquitous, circulating cellular protein.

REFERENCES

Altschuler, Y., Barbas, S. M., Terlecky, L. J., Tang, K., Hardy, S., Mostov, K. E. and Schmid, S. L. (1998). Redundant and distinct functions for dynamin-1 and dynamin-2 isoforms. *J Cell Biol* **143**, 1871-81.

Altschuler, Y., Liu, S., Katz, L., Tang, K., Hardy, S., Brodsky, F., Apodaca, G. and Mostov, K. (1999). ADP-ribosylation factor 6 and endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* **147**, 7-12.

Amraei, M., Jia, Z., Reboul, P. and Nabi, I. R. (2003). Acid-induced conformational changes in phosphoglucose isomerase result in its increased cell surface association and deposition on fibronectin fibrils. *J Biol Chem* **278**, 38935-41.

Amraei, M. and Nabi, I. R. (2002). Species specificity of the cytokine function of phosphoglucose isomerase. *FEBS Lett* **525**, 151-155.

Baneyx, G., Baugh, L. and Vogel, V. (2001). Coexisting conformations of fibronectin in cell culture imaged using fluorescence resonance energy transfer. *PNAS* **98**, 14464-68.

Baneyx, G., Baugh, L. and Vogel, V. (2002). Supramolecular Chemistry And Self-assembly Special Feature: Fibronectin extension and unfolding within cell matrix fibrils controlled by cytoskeletal tension. *PNAS* **99**, 5139-43.

Benlimame, N., Le, P. U. and Nabi, I. R. (1998). Localization of autocrine motility factor receptor to caveolae and clathrin-independent internalization of its ligand to smooth endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the Cell* **9**, 1773-86.

Bodansky, O. (1954). Serum phosphohexose isomerase in cancer II. As an index of tumor growth in metastatic carcinoma of the breast. *Cancer* **7**, 1200-26.

Bottaro, D. P. (2002). The Role of Extracellular Matrix Heparan Sulfate Glycosaminoglycan in the Activation of Growth Factor Signaling Pathways. *Ann NY Acad Sci* **961**, 158.

Bruch, P., Schnackerz, K. D. and Gracy, R. W. (1976). Matrix-bound phosphoglucose isomerase. Formation and properties of monomers and hybrids. *Eur J Biochem* **68**, 153-8.

Chaput, M., Claes, V., Portetelle, D., Cludts, I., Cravador, A., Burny, A., Gras, H. and Tartar, A. (1988). The neurotrophic factor neuroleukin is 90% homologous with phosphohexose isomerase. *Nature* **332**, 454-7.

Copley, S. D. (2003). Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Current Opinion in Chemical Biology* **7**, 265-72.

Dang, C. V. and Semenza, G. L. (1999). Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* **24**, 68-72.

Dardik, R. and Lahav, J. (1999). Functional Changes in the Conformation of Thrombospondin-1 during Complexation with Fibronectin or Heparin*1. *Experimental Cell Research* **248**, 407-14.

Davis, G. E., Bayless, K. J., Davis, M. J. and Meininger, G. A. (2000). Regulation of Tissue Injury Responses by the Exposure of Matricryptic Sites within Extracellular Matrix Molecules. *Am J Pathol* **156**, 1489-98.

Dyson, J. E. and Noltmann, E. A. (1968). The effect of pH and temperature on the kinetic parameters of phosphoglucose isomerase. Participation of histidine and lysine in a proposed dual function mechanism. *J Biol Chem* **243**, 1401-14.

Faik, P., Walker, J. I. H., Redmill, A. A. M. and Morgan, M. J. (1988). Mouse glucose-6-phosphate isomerase and neuroleukin have identical 3' sequences. *Nature* **332**, 455-57.

Fang, S., Ferrone, M., Yang, C., Jensen, J. P., Tiwari, S. and Weissman, A. M. (2001). The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14422-7.

Felder, S., Miller, K., Moehren, G., Ullrich, A., Schlessinger, J. and Hopkins, C. R. (1990). Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell* **61**, 623-34.

Folkman, J. and Shing, Y. (1992). Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. *Adv Exp Med Biol* **313**, 355-364.

Funasaka, T., Haga, A., Raz, A. and Nagase, H. (2001). Tumor Autocrine Motility Factor Is an Angiogenic Factor That Stimulates Endothelial Cell Motility. *Biochem Biophys Res Commun* **285**, 118-28.

Funasaka, T., Haga, A., Raz, A. and Nagase, H. (2002). Autocrine motility factor secreted by tumor cells upregulates vascular endothelial growth factor receptor (Flt-1) expression in endothelial cells. *Int J Cancer* **101**, 217-23.

Futter, C. E., Pearse, A., Hewlett, L. J. and Hopkins, C. R. (1996). Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J Cell Biol* **132**, 1011-23.

Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R. and Yamada, K. M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 793-805.

Goerges, A. L. and Nugent, M. A. (2003). Regulation of vascular endothelial growth factor binding and activity by extracellular pH. *J Biol Chem* **278**, 19518-25.

Goerges, A. L. and Nugent, M. A. (2004). pH regulates vascular endothelial growth factor binding to fibronectin: a mechanism for control of extracellular matrix storage and release. *J Biol Chem* **279**, 2307-15.

Gurney, M. E., Apatoff, B. R. and Heinrich, S. P. (1986a). Suppression of terminal axonal sprouting at the neuromuscular junction by monoclonal antibodies against a muscle-derived antigen of 56,000 daltons. *Journal of Cell Biology* **102**, 2264-72.

Gurney, M. E., Apatoff, B. R., Spear, G. T., Baumel, M. J., Antel, J. P., Brown Bania, M. and Reder, A. T. (1986b). Neuroleukin: A lymphokine product of lectin-stimulated T cells. *Science* **234**, 574-81.

Hocking, D. C., Sottile, J. and Langenbach, K. J. (2000). Stimulation of integrin-mediated cell contractility by fibronectin polymerization. *J Biol Chem* **275**, 10673-82.

Homandberg, G. A., Williams, J. E., Grant, D., Schumacher, B. and Eisenstein, R. (1985). Heparin-binding fragments of fibronectin are potent inhibitors of endothelial cell growth. *Am J Pathol* **120**, 327-32.

Hynes, R. O. and Wyke, J. A. (1975). Alterations in surface proteins in chicken cells transformed by temperature-sensitive mutants of Rous sarcoma virus. *Virology* **64**, 492-04.

Jeffery, C. J. (1999). Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci* **24**, 8-11.

Kenworthy, A. K. (2001). Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods* **24**, 289-96.

Le, P. U., Benlimame, N., Lagana, A., Raz, A. and Nabi, I. R. (2000). Clathrin-mediated endocytosis and recycling of autocrine motility factor receptor to

fibronectin fibrils is a limiting factor for NIH-3T3 cell motility. *Journal of Cell Science* **113**, 3227-40.

Le, P. U., Guay, G., Altschuler, Y. and Nabi, I. R. (2002). Caveolin-1 Is a Negative Regulator of Caveolae-mediated Endocytosis to the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* **277**, 3371-79.

Le, P. U. and Nabi, I. R. (2003). Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **116**, 1059-71.

Liotta, L. A., Mandler, R., Murano, G., Katz, D. A., Gordon, R. K., Chiang, P. K. and Schiffman, E. (1986). Tumor cell autocrine motility factor. *Proceedings of the National Academy of Science* **83**, 3302-6.

Luo, Y., Long, J. M., Lu, C., Chan, S. L., Spangler, E. L., Mascarucci, P., Raz, A., Longo, D. L., Mattson, M. P., Ingram, D. K. et al. (2002). A link between maze learning and hippocampal expression of neuroleukin and its receptor gp78. *J Neurochem* **80**, 354-61.

Mandik-Nayak, L., Wipke, B. T., Shih, F. F., Unanue, E. R. and Allen, P. M. (2002). Despite ubiquitous autoantigen expression, arthritogenic autoantibody response initiates in the local lymph node. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14368-73.

Matsumoto, I., Staub, A., Benoist, C. and Mathis, D. (1999). Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science* **286**, 1732-5.

Mercurius, K. O. and Morla, A. O. (1998). Inhibition of vascular smooth muscle cell growth by inhibition of fibronectin matrix assembly. *Circ Res* **82**, 548-56.

Miao, H. Q., Ishai-Michaeli, R., Atzmon, R., Peretz, T. and Vlodavsky, I. (1996). Sulfate moieties in the subendothelial extracellular matrix are involved in

basic fibroblast growth factor sequestration, dimerization, and stimulation of cell proliferation. *J Biol Chem* **271**, 4879-86.

Mishra, S., Raz, A. and Murphy, L. J. (2004). Insulin-like growth factor binding protein-3 interacts with autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase (AMF/PGI) and inhibits the AMF/PGI function. *Cancer Res* **64**, 2516-22.

Molnar, J., Hoekstra, S., Ku, C. S. and Van Alten, P. (1987). Evidence for the recycling nature of the fibronectin receptor of macrophages. *J Cell Physiol* **131**, 374-83.

Nabi, I. R. and Le, P. U. (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol* **161**, 673-77.

Nabi, I. R., Watanabe, H. and Raz, A. (1990). Identification of B16-F1 melanoma autocrine motility-like factor receptor. *Cancer Research* **50**, 409-14.

Naughton, D. P. (2003). Hypoxia-induced upregulation of the glycolytic enzyme glucose-6-phosphate isomerase perpetuates rheumatoid arthritis. *Med Hypotheses* **60**, 332-34.

Niizeki, H., Kobayashi, M., Horiuchi, I., Akakura, N., Chen, J., Wang, J., Hamada, J. I., Seth, P., Katoh, H., Watanabe, H. et al. (2002). Hypoxia enhances the expression of autocrine motility factor and the motility of human pancreatic cancer cells. *Br J Cancer* **86**, 1914-19.

Olden, K. and Yamada, K. M. (1977). Mechanism of the decrease in the major cell surface protein of chick embryo fibroblasts after transformation. *Cell* **11**, 957-69.

Pankov, R. and Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* **115**, 3861-63.

Pasqualini, R., Bourdoulous, S., Koivunen, E., Woods, V. L., Jr. and Ruoslahti, E. (1996). A polymeric form of fibronectin has antimetastatic effects against multiple tumor types. *Nature Medicine* **2**, 1197-1203.

Pennock, S. and Wang, Z. (2003). Stimulation of Cell Proliferation by Endosomal Epidermal Growth Factor Receptor As Revealed through Two Distinct Phases of Signaling. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5803-15.

Pereira, M., Rybarczyk, B. J., Odrliin, T. M., Hocking, D. C., Sottile, J. and Simpson-Haidaris, P. J. (2002). The incorporation of fibrinogen into extracellular matrix is dependent on active assembly of a fibronectin matrix. *J Cell Sci* **115**, 609-17.

Pierini, L. M., Lawson, M. A., Eddy, R. J., Hendey, B. and Maxfield, F. R. (2000). Oriented endocytic recycling of alpha 5beta 1 in motile neutrophils. *Blood* **95**, 2471-80.

Ponting, C. P. (2000). Proteins of the endoplasmic-reticulum-associated degradation pathway: domain detection and function prediction. *Biochem J* **351 Pt 2**, 527-35.

Registre, M., Goetz, J., St. Pierre, P., Pang, H., Lagacé, M., Bouvier, M., Le, P. and Nabi, I. (2004). The gene product of the gp78/AMFR ubiquitin E3 ligase cDNA is selectively recognized by the 3F3A antibody within a subdomain of the endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun* **320**, 1316-22.

Ruoslahti, E., Yamaguchi, Y., Hildebrand, A. and Border, W. A. (1992). Extracellular matrix/growth factor interactions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **57**, 309-15.

Saoncella, S., Echtermeyer, F., Denhez, F., Nowlen, J. K., Mosher, D. F., Robinson, S. D., Hynes, R. O. and Goetinck, P. F. (1999). Syndecan-4 signals

cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2805-10.

Schaller, M., Burton, D. R. and Ditzel, H. J. (2001). Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease. *Nat Immunol* **2**, 746-53.

Schulz, L. C. and Bahr, J. M. (2003). Glucose-6-phosphate isomerase is necessary for embryo implantation in the domestic ferret. *PNAS* **100**, 8561-66.

Schwartz, M. K. (1973). Enzymes in cancer. *Clinical Chemistry* **19**, 10-22.

Shimizu, K., Tani, M., Watanabe, H., Nagamachi, Y., Niinaka, Y., Shiroishi, T., Ohwada, S., Raz, A. and Yokota, J. (1999). The autocrine motility factor receptor gene encodes a novel type of seven transmembrane protein. *FEBS Letters* **456**, 295-300.

Silletti, S., Paku, S. and Raz, A. (1998). Autocrine motility factor and the extracellular matrix. II. Degradation or remodeling of substratum components directs the motile response of tumor cells. *International Journal of Cancer* **76**, 129-135.

Smalheiser, N. R. (1996). Proteins in unexpected locations. *Mol Biol Cell* **7**, 1003-14.

Sorkin, A. (2001). Internalization of the epidermal growth factor receptor: role in signalling. *Biochem Soc Trans* **29**, 480-4.

Sottile, J. and Hocking, D. C. (2002). Fibronectin Polymerization Regulates the Composition and Stability of Extracellular Matrix Fibrils and Cell-Matrix Adhesions. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3546-59.

Timar, J., Trikha, M., Szekeres, K., Baza, R., Tovari, J., Silletti, S., Raz, A. and Honn, K. V. (1996). Autocrine motility factor signals integrin-mediated metastatic melanoma cell adhesion and invasion. *Cancer Research* **56**, 1902-08.

Torimura, T., Ueno, T., Kin, M., Harada, R., Nakamura, T., Kawaguchi, T., Harada, M., Kumashiro, R., Watanabe, H., Avraham, R. et al. (2001). Autocrine motility factor enhances hepatoma cell invasion across the basement membrane through activation of beta1 integrins. *Hepatology* **34**, 62-71.

Tsutsumi, S., Gupta, S. K., Hogan, V., Collard, J. G. and Raz, A. (2002). Activation of small GTPase Rho is required for autocrine motility factor signaling. *Cancer Res* **62**, 4484-90.

Tsutsumi, S., Hogan, V., Nabi, I. R. and Raz, A. (2003). Overexpression of the autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase induces transformation and survival of NIH-3T3 fibroblasts. *Cancer Res* **63**, 242-9.

Verderio, E., Nicholas, B., Gross, S. and Griffin, M. (1998). Regulated Expression of Tissue Transglutaminase in Swiss 3T3 Fibroblasts: Effects on the Processing of Fibronectin, Cell Attachment, and Cell Death*1. *Experimental Cell Research* **239**, 119-138.

Vlodavsky, I., Miao, H. Q., Medalion, B., Danagher, P. and Ron, D. (1996). Involvement of heparan sulfate and related molecules in sequestration and growth promoting activity of fibroblast growth factor. *Cancer Metastasis Rev* **15**, 177-186.

Watanabe, H., Takehana, K., Date, M., Shinozaki, T. and Raz, A. (1996). Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide. *Cancer Research* **56**, 2960-63.

Watanabe, H., Takeuchi, K. and Chigira, M. (1994). Expression of autocrine motility-like factor in rheumatoid synovial fluid. *Journal of Rheumatology* **21**, 37-40.

Wierzbicka-Patynowski, I. and Schwarzbauer, J. E. (2003). The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J Cell Sci* **116**, 3269-76.

Wouters, F. S., Verveer, P. J. and Bastiaens, P. I. (2001). Imaging biochemistry inside cells. *Trends Cell Biol* **11**, 203-11.

Xu, W., Seiter, K., Feldman, E., Ahmed, T. and Chiao, J. W. (1996). The differentiation and maturation mediator for human myeloid leukemia cells shares homology with neuroleukin or phosphoglucose isomerase. *Blood* **87**, 4502-6.

Yi, M. and Ruoslahti, E. (2001). A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 620-4.

Yoon, D. Y., Buchler, P., Saarikoski, S. T., Hines, O. J., Reber, H. A. and Hankinson, O. (2001). Identification of genes differentially induced by hypoxia in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 882-6.

Zhi, J., Sommerfeldt, D. W., Rubin, C. T. and Hadjiargyrou, M. (2001). Differential expression of neuroleukin in osseous tissues and its involvement in mineralization during osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* **16**, 1994-2004.

Zhong, C., Chrzanowska-Wodnicka, M., Brown, J., Shaub, A., Belkin, A. M. and Burridge, K. (1998). Rho-mediated Contractility Exposes a Cryptic Site in Fibronectin and Induces Fibronectin Matrix Assembly. *J. Cell Biol.* **141**, 539-51.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Deane Mosher for kindly providing the FN null fibroblasts and labeled FN and Michel Bouvier for his helpful suggestion concerning the FRET analysis. This study was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research (IRN). IRN is a recipient of a CIHR Investigator award and AL the recipient of an FRSQ studentship.

Figure 2. Subcellular localization of the AMF-HA fusion protein. Cos7 cells were transiently transfected with cDNA coding for AMF-HA and fixed with paraformaldehyde prior to (A, B) or after (C, D) Triton X-100 permeabilization. The cells were then immunofluorescently double labeled with anti-HA antibody and Alexa 488 conjugated anti-mouse secondary antibodies (A, C) and Texas Red phalloidin to reveal F-actin (B, D). AMF-HA is diffusely localized within the cytoplasm and concentrates at peripheral actin densities (A, B). Prior treatment with Triton-X100 extracts AMF-HA (C) but not F-actin (D) demonstrating the cytosolic distribution of AMF-HA and its weak association with actin rich protrusions. Bar = 10 μ m.

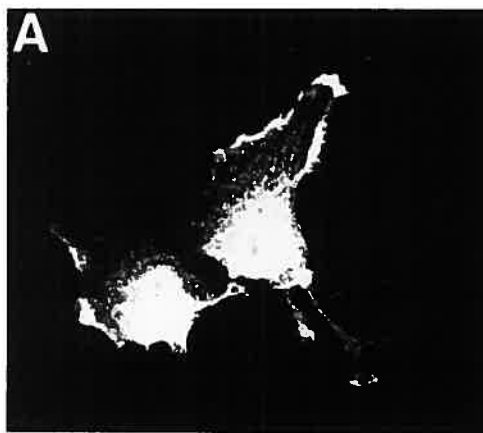


Figure 3. Glycolysis regulates AMF-HA association with actin-rich protrusions. Cos7 cells transiently transfected with cDNA coding for AMF-HA were left untreated (A, B, C), treated with 100 mM oxamate for 1 hour (D, E, F) or with 100 mM oxamate and 100 mM pyruvate for 1 hour (G, H, I) before fixation with paraformaldehyde and immunofluorescent labeling with anti-HA antibody and Alexa 488 conjugated anti-mouse secondary antibodies (A, D, G) and Texas Red phalloidin to reveal F-actin (B, E, H). Confocal images from both fluorescent channels were superimposed (C, F, I) and colocalization appears in yellow. Bar = 10 μ m.

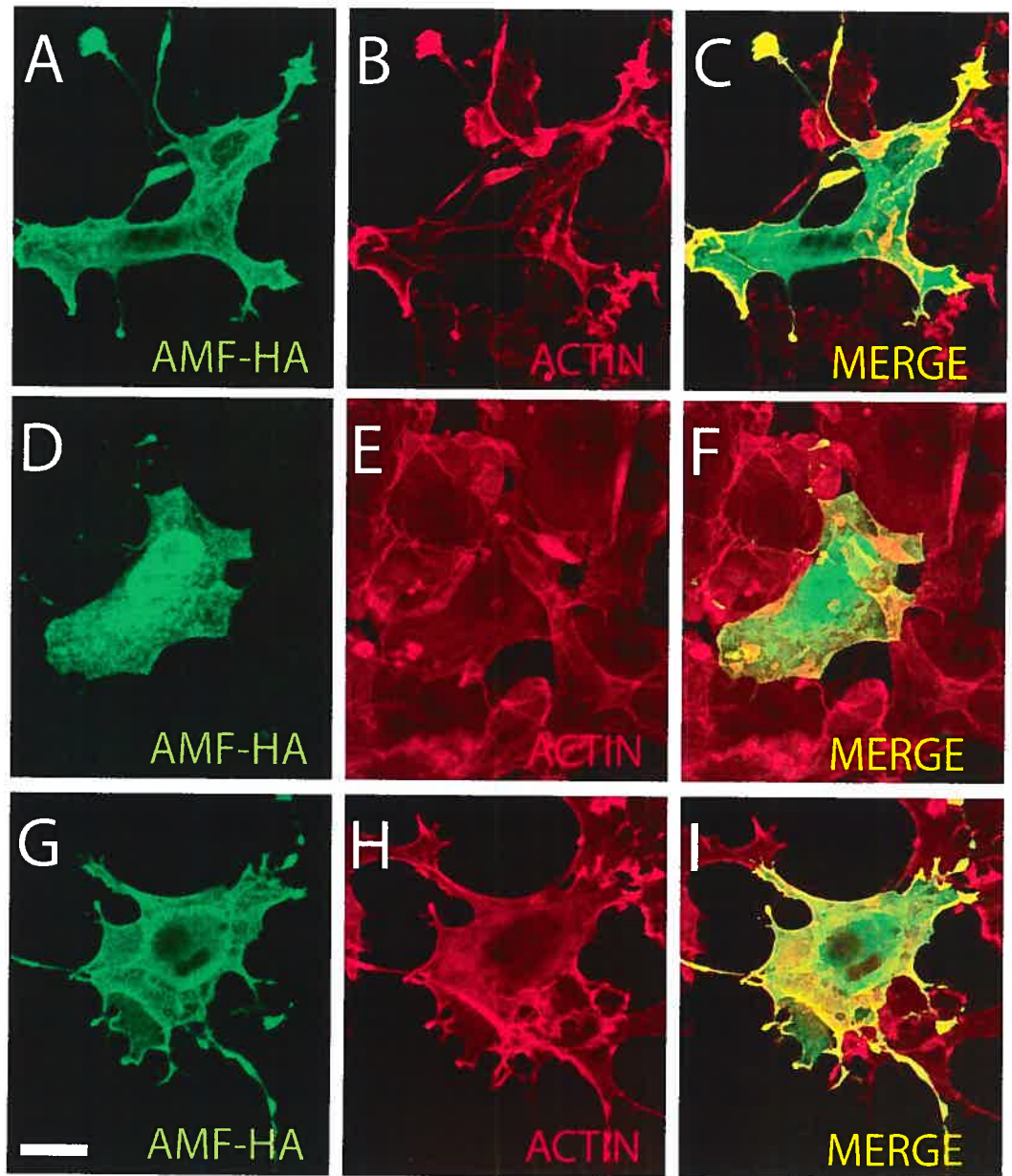
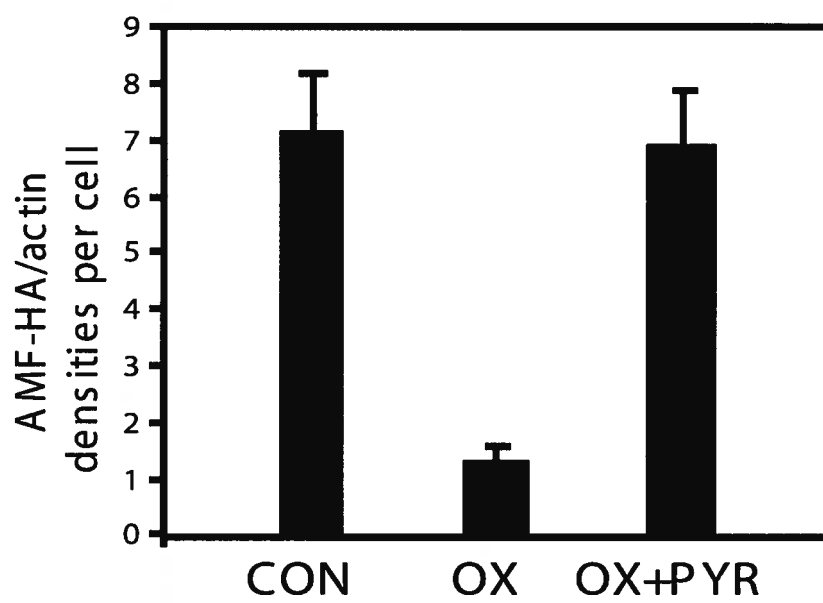


Figure 4. Quantification of AMF-HA association with actin-rich protrusions. For at least 15 Cos7 cells transiently transfected with cDNA coding for AMF-HA, the number of AMF-HA concentrations which colocalized with peripheral actin densities (as in Figures 2 and 3) were counted per cell for cells left untreated (CTL) or treated with 100 mM oxamate for 1 hour (OX) or with 100 mM oxamate and 100 mM pyruvate for 1 hour (OX+PYR).



ARTICLE 2**pH specific sequestration of phosphoglucose
isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin by
matrix fibronectin and heparan sulphate**

Annick Lagana, Yoram Altschuler, and Ivan R. Nabi

CONTRIBUTION DES AUTEURS

J'ai effectué toutes les expériences qui sont présentées dans cet article et j'ai participé à la rédaction de l'article.

Le **Dr Yoram Altschuler** nous a fourni des adénovirus contenant l'ADNc codant pour les protéines dominantes négative de la clathrine, la Cla-hub et de la dynamine-1, dyn K44A. De plus, il a participé à la rédaction de l'article.

Mon directeur de recherche, **Le Dr Ivan R. Nabi**, m'a aidé tout au long de ce projet de recherche et a participé à la rédaction de l'article.

pH specific sequestration of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin by matrix fibronectin and heparan sulphate

Annick Lagana¹, Yoram Altschuler², and Ivan R. Nabi^{1,3}

¹Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7; ²Department of Pharmacology, Hebrew University of Jerusalem, Israel; ³Department of Anatomy, Cell Biology and Physiology, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada V6T 1Z3

Running title: Sequestration of PGI/AMF by fibronectin

Correspondence:

Ivan R. Nabi, Professor

Department of Anatomy, Cell Biology and Physiology

University of British Columbia

2177 Wesbrook Mall

Vancouver, BC, Canada V6T 1Z3

Tel: (604) 822-7000; Fax: (604) 822-2316

[REDACTED]

SUMMARY

Phosphoglucose isomerase (PGI) is a glycolytic enzyme that moonlights as a cytokine under the aliases autocrine motility factor (AMF), neuroleukin and maturation factor. The cytokine function of PGI/AMF targets multiple cell types however mechanisms that regulate and sequester this ubiquitous, circulating cytokine remain largely unidentified. PGI/AMF is shown here to bind selectively to cell-associated fibrillar fibronectin. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) experiments show that energy transfer was detected at acid pH but not at neutral pH indicating that PGI/AMF binds directly to fibronectin at acid pH. Heparan sulphate does not affect cell association of PGI/AMF at neutral pH but enhances the cell surface association of PGI/AMF at acid pH. The increased cell surface binding of PGI at acid pH in the presence of heparan sulphate occurs independently of fibronectin expression identifying two distinct mechanisms for PGI/AMF sequestration under acidic conditions. At neutral pH, the indirect interaction of PGI/AMF with fibronectin requires prior clathrin-dependent endocytosis and is therefore receptor-mediated. PGI/AMF undergoes a second round of endocytosis upon recycling to the plasma membrane such that association with fibronectin fibrils serves to sequester recycling PGI/AMF receptor complexes. The multiple highly specific mechanisms for the sequestration of PGI/AMF may represent acquired mechanisms to regulate and harness the cytokine function of PGI/AMF.

ABBREVIATIONS:

PGI: phosphoglucose isomerase; AMF: autocrine motility factor; gp78: glycoprotein of 78 KDa, AMFR: autocrine motility factor-receptor; RA: rheumatoid arthritis; VEGF-R: vascular endothelial growth factor receptor; Flt-1: flt-1; FN: fibronectin; ECM: extracellular matrix; ER: endoplasmic reticulum; FRET: fluorescent resonance energy transfer; HS: heparan sulphate; HA; anti-hemagglutinin; dynWT: wild-type dynamin-1; dynK44A: dominant negative dynamin-1 K44A mutant; Cla-hub: T7-tagged clathrin hub; tTA: tetracycline-regulated promoter; FITC: fluorescein isothiocyanate; MVB: multivesicular bodies; FAK: focal adhesion kinase; PKC: protein kinase C; PI3-K: phosphatidylinositol 3-kinase; MEK: MAP kinase kinase; JNK: c-jun N-terminal kinase; HIF-1: hypoxia inducible factor; m β CD: Methylbeta-cyclodextrine.

INTRODUCTION

Phosphoglucose isomerase (PGI, EC 5.3.1.9) is a glycolytic enzyme expressed in all cells that plays an essential role in gluconeogenesis. It represents an example of a moonlighting protein that also functions as an extracellular cytokine (Copley, 2003; Jeffery, 1999; Smalheiser, 1996). The neurokinine, neuroleukin, was identified in 1986 and shown to increase the survival of cultured sensory neurons and, following secretion by lectin-stimulated T cells, to induce the maturation of B-cells into antibody secreting cells (Gurney et al., 1986a; Gurney et al., 1986b). Subsequent comparison of the sequence of neuroleukin with that of PGI revealed identity between the two proteins, raising the question as to how a ubiquitous, cytosolic enzyme could also function as an extracellular cytokine (Chaput et al., 1988; Faik et al., 1988). The demonstration in 1996 that autocrine motility factor (AMF), a tumor secreted cytokine, and maturation factor, a lymphokine, were identical to PGI confirmed the extracellular moonlighting cytokine function of this glycolytic enzyme (Watanabe et al., 1996; Xu et al., 1996). The association of hippocampal expression of PGI/AMF and its receptor (gp78 or AMFR) with learning and memory (Luo et al., 2002) and the ability of PGI/AMF to induce the differentiation of human myeloid cells into monocytes (Xu et al., 1996) further supported the previously reported neurokinine and lymphokine functions of PGI/AMF (Gurney et al., 1986a; Gurney et al., 1986b). PGI/AMF cytokine activity has also been shown to be involved in osteoblast differentiation during mineralization (Zhi et al., 2001) and to be necessary for embryo implantation (Schulz and Bahr, 2003). PGI/AMF is therefore a ubiquitous cytokine with multiple cellular and tissular targets.

As AMF, PGI was identified as a cytokine secreted by tumor cells whose expression is linked to tumor cell invasion and metastasis (Liotta et al., 1986; Watanabe et al., 1996). Serum PGI/AMF activity has long been reported and is associated with tumor expression (Bodansky, 1954; Schwartz, 1973) indicating that this protein is actively released from both normal and tumor cells. Overexpression of PGI/AMF by stable transfection of NIH-3T3 cells has shown that its *de novo* secretion is sufficient for cellular transformation and tumorigenicity (Tsutsumi et al., 2003). PGI/AMF also stimulates angiogenesis via the paracrine stimulation of vascular endothelial growth factor receptor (VEGF-R) Flt-1 expression (Funasaka et al., 2001; Funasaka et al., 2002). Interestingly, both PGI/AMF and VEGF have recently been reported to exhibit pH dependent binding to fibronectin (FN) (Amraei et al., 2003; Goerges and Nugent, 2003; Goerges and Nugent, 2004). pH-dependent association with FN may serve to sequester angiogenic cytokines under conditions of hypoxia and consequent acidification that can subsequently serve to induce angiogenesis towards the damaged region (Goerges and Nugent, 2004).

PGI/AMF cytokine activity is found in rheumatoid synovial fluid (Watanabe et al., 1994) and its deposition on synovial surfaces and ability to induce an autoimmune response in rheumatoid arthritis (RA) identified it as a possible autoantigen different from normal circulating PGI/AMF (Mandik-Nayak et al., 2002; Matsumoto et al., 1999; Schaller et al., 2001). Our demonstration that acid-induced changes in the tertiary structure of PGI/AMF strongly increase its association with the extracellular fibronectin matrix argues that changes in local microenvironment could alter the behaviour of the protein (Amraei et al., 2003). Indeed, intra-articular hypoxia in rheumatoid joints and consequent upregulation of PGI/AMF has been suggested to perpetuate RA (Naughton, 2003). Involvement of PGI/AMF in RA may

stearothermophilus) et de mammifère (*lapin, porc, humain*) ont été notées au niveau des domaines périphériques de la protéine et particulièrement au niveau du motif S185NID188, impliqué dans la sécrétion de la protéine, qui est absent de la séquence de la PGI de *bactérie* où le résidu sérine est remplacé par un résidu glycine (Sun, Chou et al. 1999; Haga, Niinaka et al. 2000). La sécrétion de la PGI et sa fonction cytokine pourraient être des propriétés acquises par les cellules au cours de l'évolution.

Nos études ont montré que L'AMF/PGI-HA était concentrée dans les lamellipodes et les pseudopodes des cellules Cos et nos marquages en fluorescence montrent que cette concentration est proche de la membrane plasmique des cellules. L'interaction entre les enzymes de la glycolyse et le cytosquelette d'actine a souvent été observée (Masters 1984; Lanzara and Grazi 1987; Mejean, Pons et al. 1989; Wang, Morris et al. 1996; Rogalski-Wilk and Cohen 1997). Le traitement des cellules au Triton X-100 (un détergent) a permis d'extraire totalement l'AMF/PGI-HA des cellules sans affecter le cytosquelette d'actine, donc les deux protéines sont très proches mais elles ne sont pas fortement associées. La concentration de l'AMF/PGI, dans une région proche de la membrane, pourrait favoriser son exportation vers le milieu extracellulaire. Toutefois, nous n'avons jamais observé de bourgeonnement d'exosomes qui contiendraient l'AMF, comme c'est le cas pour les galectines. Toutefois, l'AMF pourrait être exportée par un transporteur membranaire comme le FGF-2 qui semble être exporté par la pompe Na/K ATPase (Florkiewicz, Anchin et al. 1998).

2 LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DE FIBRONECTINE

La tumorigénicité des cellules est depuis longtemps associée avec la réduction de l'expression de la FN et de son récepteur, l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ (Vaheri and Ruoslahti 1975; Mautner and Hynes 1977). Les cellules tumorales étudiées exprimaient peu de FN et d'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ et la restauration de l'expression de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ et de la FN réduisait la prolifération des cellules tumorales *in vitro* et la croissance des tumeurs *in vivo* (Giancotti and Ruoslahti 1990; Varner, Emerson et al. 1995; Akamatsu, Ichihara-Tanaka et al. 1996). Ces résultats étaient appuyés par le fait que la survie et la croissance des cellules normales dépendent de l'adhésion cellulaire aux protéines de la MEC, alors que ce n'est pas le cas des cellules malignes (Dike and Farmer 1988; Meredith, Fazeli et al. 1993; Frisch 1994) et que les cellules tumorales expriment une grande variété de métalloprotéases qui dégradent les constituants de la MEC (Matrisian 1992; Nelson, Fingleton et al. 2000; Marquez-Curtis, Dobrowsky et al. 2001; Klein, Vellenga et al. 2004).

La croissance des tumeurs a été étudiée dans des souris hétérozygotes mutées sur les gènes de la FN et de l'intégrine $\alpha 5$ (Taverna, Ullman-Cullere et al. 1998). Les résultats ont montré que la perte de l'expression de la FN et de l'intégrine $\alpha 5$ n'était pas associée avec une augmentation de la formation des tumeurs, ou une augmentation du niveau de métastase, même lorsque la mutation de la FN ou de l'intégrine $\alpha 5$ était combinée avec la mutation du gène *suppresseur* de tumeur p53 (Taverna, Ullman-Cullere et al. 1998).

D'autres études ont montrées que la surexpression de la FN pouvait être associée avec l'augmentation de la tumorigénicité des cellules (Akiyama, Olden et al. 1995; Wu, Keightley et al. 1998) et que lorsqu'elle n'était pas totalement

dégradée par les métalloprotéases, la FN pouvait être fortement exprimée dans les tumeurs (Arihiro, Inai et al. 1993; David, Nesland et al. 1994; Ioachim, Charchanti et al. 2002; Hegele, Heidenreich et al. 2003). L'interaction entre les intégrines et la FN serait impliquée dans la migration, l'invasion et la métastase des cellules tumorales (Liaw and Crawford 1999).

Donc, contrairement à ce qui avait été conclu des études effectuées à partir de cellules en culture, la perte de l'expression de la FN et de son récepteur n'est pas toujours une conséquence de la transformation des cellules et ne favorise pas l'implantation des tumeurs.

Nos études sur les cellules PyMT *Mgat5* ont montré que la perte de l'invasivité et de la tumorigénicité des cellules *Magt5^{-/-}* (Granovsky, Fata et al. 2000) était accompagnée de la perte de l'expression et de la fibrillogénèse de la FN alors que le niveau d'expression des intégrines était inchangé. La relation entre la fibrillogénèse de la FN et la tumorigénicité des cellules semble donc dépendre du type de cellule et du type de cancer étudié.

L'importance de l'AMF, de l'AMF-R, de *Mgat5* et de la galectine-3 dans les différents mécanismes cellulaires reliés à la tumorigénicité des cellules a été démontrée (Liotta, Mandler et al. 1986; Silletti, Watanabe et al. 1991; Watanabe, Carmi et al. 1991; Dennis, Granovsky et al. 1999; Granovsky, Fata et al. 2000; Haga, Niinaka et al. 2000; Fang, Ferrone et al. 2001; Funasaka, Haga et al. 2001; Torimura, Ueno et al. 2001; Van Den Brule, Califice et al. 2002; Haga, Funasaka et al. 2003; Liang, Kim et al. 2003; Takenaka, Fukumori et al. 2004; Yu, Liao et al. 2004). Nous avons étudié la relation entre ces quatre protéines et la matrice de FN.

2.1 L'association de l'AMF avec la matrice de fibronectine

Les travaux de notre laboratoire ont permis de caractériser que le complexe AMF/AMF-R était endocyté selon deux voies d'endocytose distinctes, une voie dépendante des cavéoles qui endocytent le complexe AMF/AMF-R vers le REL et une voie dépendante des vésicules recouvertes de clathrine qui endocytent l'AMF/AMF-R vers des MVBs, puis le recyclent vers les fibrilles de FN à la surface des cellules (Benlimame, Le et al. 1998; Le, Benlimame et al. 2000; Le, Guay et al. 2002; Le and Nabi 2003).

2.1.1 L'endocytose de l'AMF/AMF-R est indispensable à son association avec la matrice de fibronectine

Les travaux précédents effectués dans notre laboratoire nous laissaient penser que l'AMF devait sans doute être endocyté par les vésicules recouvertes de clathrine pour s'associer aux fibrilles de FN à la surface des cellules et que cette association était indépendante des cavéoles. L'inhibition du recyclage des endosomes par le traitement des cellules à 20°C inhibait l'association de l'AMF avec les fibrilles de FN alors que le traitement des cellules avec le M β CD, un inhibiteur des cavéoles, n'avait aucun effet sur cette association (Le, Benlimame et al. 2000). Toutefois, ces démonstrations étaient indirectes et il aurait été possible que l'AMF qui s'associait aux fibrilles de FN provienne de la surface de la cellule et non du recyclage de l'AMF depuis les MVBs.

L'expression des formes dominantes négatives de la clathrine, Cla-Hub, et de la dynamine-1, la dynK44A, qui bloquent la voie d'endocytose des vésicules recouvertes de clathrine (Altschuler, Barbas et al. 1998; Altschuler, Liu et al. 1999;

Le, Guay et al. 2002) ont confirmé qu'à pH neutre, l'AMF devait être endocytée vers les MVBs pour s'associer aux fibrilles de FN et que cette association ne s'effectuait pas directement à la surface des cellules. De plus, la coincubation des cellules NIH-3T3 en présence d'AMF et de FN a montré que l'AMF ne s'associait pas avec la FN au niveau des CMVs pendant ses cycles de recyclage, mais que cette association s'effectuait à la surface des cellules.

2.1.2 L'AMF s'associe spécifiquement à la fibronectine fibrillaire

L'utilisation de cellules fibroblastiques FN^{-/-}, qui n'expriment pas la FN, nous a permis d'étudier la spécificité de l'association de l'AMF avec la FN plutôt qu'avec une autre protéine de la MEC. Nous avons observé que l'AMF s'associait spécifiquement à la FN fibrillaire plutôt qu'à la FN dimérique soluble du substrat. La FN est une protéine très importante pour l'organisation de la MEC (Hynes 1990). Il serait intéressant d'effectuer des triples marquages de l'AMF et de la FN avec d'autres protéines de la MEC comme la laminine et le collagène, pour déterminer si ces protéines interagissent avec la FN dans les zones de contact avec l'AMF.

La FN dimérique cache de nombreux sites cryptiques qui sont mis à jour au moment du dépliement du dimère induit par la liaison de la FN avec les intégrines (Pankov and Yamada 2002; Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer 2003). Ces sites cryptiques sont impliqués dans l'association des dimères de FN entre eux et aux autres constituants de la MEC (Barry and Mosher 1989; Magnusson and Mosher 1998; Pankov and Yamada 2002).

La spécificité de la liaison de l'AMF à la FN fibrillaire par rapport à la FN dimérique laisse imaginer que l'AMF pourrait se lier à certains sites cryptiques spécifiques de la FN. Des tests de liaison effectués avec certains fragments

protéolytiques de la FN, par exemple le domaine d'assemblage N-terminal de 70 kDa, ou les domaines III₁ et III₁₀ de la FN qui ne sont accessibles qu'au moment du dépliement du dimère de FN (Pankov and Yamada 2002; Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer 2003), pourraient répondre à cette question.

2.1.3 Est-ce que l'association du complexe AMF/AMF-R aux fibrilles de fibronectine dépend de la fibrillogénèse?

La fibrillogénèse de la FN dépend de nombreux paramètres liés à l'activité de la cellule. Elle dépend de la liaison de la FN aux intégrines, de la tension appliquée sur la cellule par l'activité du cytosquelette d'actine, de l'expression de la tensine, de FAK et des syndécans (Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer 2003). Est-ce que les mécanismes reliés à la fibrillogénèse favorisent l'association de l'AMF avec la FN?

Nous avons observé que l'ajout d'héparane sulfate n'avait pas d'effet sur l'association de l'AMF avec la FN à pH neutre, donc il est possible que le syndécan-4 qui est un HSPG ne soit pas impliqué dans l'association de l'AMF avec la FN. Les forces contractiles de la cellule favorisent le dépliement des dimères de FN et leur incorporation dans les fibrilles de FN (Geiger, Bershadsky et al. 2001; Zimmerman, Volberg et al. 2004). L'utilisation de drogues qui modulent la dynamique du cytosquelette d'actine comme le nocodazole, le taxol, ou la phalloïdine pourraient inhiber l'ajout de nouveaux monomères de FN sans affecter les fibrilles de FN existants. La mesure de l'association en surface de l'AMF permettrait de déterminer si elle dépend de l'incorporation de nouveaux dimères de FN. L'expression de la tensine et la FAK contrôlent la fibrillogénèse de la FN (Pankov, Cukierman et al. 2000; Ilic, Kovacic et al. 2004). L'expression contrôlée de la forme dominante

négative de la tensine et l'inhibition de l'activation de la FAK avec la génistéine, qui inhibe la phosphorylation sur les résidus tyrosines, pourraient peut-être répondre aussi à cette question.

2.1.4 Quel est le rôle de l'association de l'AMF/AMF-R à la matrice de fibronectine?

La stimulation de l'AMF-R par l'AMF est associée à la stimulation de la motilité et de la tumorigénicité des cellules. Les résultats que nous avons obtenu avec la technique de FRET et les observations que nous avons déjà effectuées dans notre laboratoire (Le, Benlimame et al. 2000) suggèrent que la matrice de FN stabiliserait le complexe AMF/AMF-R à la surface des cellules après avoir été endocyté et recyclé par les cellules. Quel est le rôle de cette association? Est-ce que l'association de l'AMF/AMF-R aux fibrilles de FN pourrait réguler l'activation du récepteur et son endocytose?

L'activité de beaucoup de récepteurs membranaires est inhibée par leur endocytose et la dégradation qui en découle dans les lysosomes (von Zastrow 2001; Holler and Dikic 2004). On serait en droit de penser que le maintien du complexe AMF/AMF-R à la surface des cellules par les fibrilles de FN pourrait prolonger son activation. Toutefois, le fait que cette association semble stable et qu'elle s'effectue après l'endocytose du complexe suggère qu'elle régule peut-être sa réendocytose par les cellules. De nombreuses études ont montré que l'activation des récepteurs membranaires pouvait réguler leur endocytose et leur recyclage et se poursuivre après leur endocytose depuis leurs compartiments endocytaires (Benmerah 2004; Miaczynska, Christoforidis et al. 2004; Weible and Hendry 2004). Il serait intéressant

de déterminer si l'association du complexe AMF/AMF-R avec la matrice n'aurait pas plutôt une fonction régulatrice négative de l'activité du récepteur.

L'étude comparative des cellules $FN^{-/-}$ et $FN^{+/+}$ pourrait permettre de déterminer si l'expression de la FN régule la migration cellulaire induite par l'AMF.

Les cycles répétés d'endocytose et de recyclage du complexe AMF/AMF-R serait également associés à la motilité des cellules. L'endocytose des vésicules recouvertes de clathrine est impliquée dans la motilité cellulaire. En effet, son inhibition par l'appauvrissement du milieu en potassium entraîne la perte de la polarité et de la motilité des fibroblastes (Altankov and Grinnell 1993). Nous avons observé que le complexe AMF/AMF-R endocyté par la voie des vésicules recouvertes de clathrine subit plusieurs cycles d'endocytose et de recyclage. Le trafic vésiculaire et le recyclage de protéines seraient impliqués dans le processus de motilité par l'apport continu de composants moléculaires et de membranes, indispensables à l'extension et à la stabilisation des pseudopodes des cellules motiles (Bretscher 1996; Nabi 1999). En particulier, la formation des contacts d'adhésion au bord avant de la cellule doit nécessiter l'apport dirigé de molécules d'adhésion, incluant les intégrines, pour stabiliser la formation des nouveaux pseudopodes. Les cycles répétés d'endocytose de l'AMF/AMF-R pourraient être impliqués dans ces mécanismes. La liaison de l'AMF/AMF-R à la matrice de FN pourrait, en régulant l'activation et le recyclage du complexe, moduler la stimulation de la motilité des cellules par l'AMF.

2.2 L'association de l'AMF avec la fibronectine à pH acide

Lorsque les tumeurs grossissent, elles deviennent hypoxiques et le pH extracellulaire peut descendre de pH7 à pH5.8 (Wike-Hooley, Haveman et al. 1984; Wike-Hooley, Van der Zee et al. 1984). Les conditions hypoxiques stabilisent la matrice de FN et augmentent sa sécrétion par les cellules (Gaus, Demir-Weusten et al. 2002).

Le fluide synovial constitue également un environnement acide, particulièrement chez les patients atteints de RA (Goldie and Nachemson 1969; Goldie and Nachemson 1970; Treuhaft and DJ 1971). Cette acidification favoriserait la liaison de la PGI à la surface des cellules synoviales (Schaller, Burton et al. 2001; Wipke, Wang et al. 2002) et la PGI agirait alors comme un auto-antigène qui serait impliqué dans la RA des souris K/BxN et chez l'humain (Matsumoto, Staub et al. 1999; Schaller, Burton et al. 2001; Matsumoto, Maccioni et al. 2002).

2.2.1 L'association de l'AMF avec la matrice est directe à pH acide

Récemment, une étude a montré que l'acidification du milieu extracellulaire bloque l'endocytose de l'AMF, et favorise l'association de l'AMF avec la matrice de FN (Amraei, Jia et al. 2003).

L'utilisation de cellules FN^{-/-} a permis de démontrer qu'à pH acide comme à pH neutre, l'association fibrillaire de l'AMF dépendait de l'expression de la FN. Les cellules FN^{-/-} incubées en présence d'AMF-Alexa568 à pH5 ne présentaient aucun marquage, ni en surface, ni au niveau des endosomes. Donc l'AMF s'associe spécifiquement à la FN.

Toutefois, nous ne savons pas si à pH5, l'AMF s'associe spécifiquement à la FN sous forme de fibrilles comme c'est le cas à pH neutre ou si, dans ces conditions

particulières, elle peut se lier à la FN dimérique. Des tests de liaison de l'AMF sur différents substrats: une matrice de FN remodelée par des cellules, de la FN dimérique, de la laminine, du collagène, permettraient de déterminer si, à pH5, l'AMF s'associe spécifiquement à la FN sous forme de fibrille, comme c'est le cas à pH neutre, ou si elle peut s'associer à la FN dimérique. L'utilisation de la technique de *Circular Dichroism Spectroscopy*, qui permet de recueillir de l'information sur la structure secondaire des protéines en solution, a permis de démontrer que l'acidification du milieu modifie la conformation de l'AMF qui devient monomérique (Amraei, Jia et al. 2003). Ce changement de conformation modifie fortement son affinité de liaison car elle s'associe alors à la matrice de FN sans être au préalable endocytée par les cellules. Ces études permettraient de mieux définir l'affinité de l'AMF en fonction du pH.

La nature de l'association de l'AMF avec la matrice de FN a été étudiée avec la technique de FRET. Cette technique utilise le principe du transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes. Nous avons effectué nos mesures sur des cellules fixées en utilisant la FN-Alexa488 comme molécule *donneuse* et l'AMF-Alexa568 comme molécule *acceptrice*. Nos mesures ont été effectuées avec un microscope confocal Leica TCS-SP1 équipé d'un objectif de 63X Plan Achromat et des lasers de longueurs d'ondes de 488 et de 568 nm. La valeur du FRET, correspondait à la différence de l'intensité de la fluorescence de la FN-Alexa488, mesurée avant et après la destruction *par photo-bleaching* de la molécule *acceptrice*, l'AMF-Alexa568. L'intensité de la fluorescence a été déterminée avec le logiciel d'analyse d'image Northern Eclipse.

La technique de FRET permet de mesurer un transfert d'énergie entre deux molécules espacées de moins de 10 nm, elle n'est donc en principe pas mesurable si une protéine fait le lien entre les deux molécules d'intérêt. L'absence de mesure de FRET, que nous avons mesuré à pH neutre, nous a montré que l'AMF n'était pas directement liée à la FN mais que cette association se faisait sans doute via son récepteur. Par contre, la valeur de FRET mesurée à pH acide a prouvé que dans ces conditions, l'association entre la FN et l'AMF était directe.

2.2.2 L'étude de la dynamique d'association de l'AMF avec la fibronectine

L'association de l'AMF avec la FN dépend du recyclage du complexe AMF/AMF-R à pH neutre alors qu'à pH acide cette association est directe. Cette association doit donc être beaucoup plus dynamique à pH neutre qu'à pH acide. La stabilité de l'association de l'AMF avec la FN pourrait être mesurée sur des cellules NIH-3T3 vivantes, incubées en présence d'AMF-Alexa488 et de FN-Alexa568, et observées avec un microscope confocal équipé d'une plaque chauffante. La mesure de l'intensité de l'AMF-Alexa488 associée à la FN-Alexa568 au cours du temps permettrait de déterminer la durée de cette association dans nos conditions expérimentales.

La dynamique de l'association de l'AMF à la matrice de FN pourrait être ensuite mesurée avec la technique de FRAP: *fluorescent recovery after photobleaching*. Cette mesure de FRAP consisterait à détruire l'AMF-Alexa488 associée aux fibrilles de FN-Alexa568 par *photo-bleaching* et de mesurer la réapparition de la fluorescence avec l'arrivée de nouvelles molécules d'AMF-Alexa488 au niveau du fibrille d'intérêt. Cette technique permettrait de quantifier le

recyclage de l'AMF-FITC au niveau des fibrilles de FN et de mieux comprendre comment s'effectue l'association de l'AMF avec la matrice de FN.

2.2.3 Qu'est-ce qui détermine l'endocytose du complexe AMF/AMF-R plutôt que son association avec la matrice de fibronectine?

Au cours du processus d'endocytose, la lumière des endosomes devient plus acide avec leur maturation (Mellman 1996). Le pH d'un MVB se situe entre pH5 et 6 (Mellman 1996). Il est donc possible que la conformation de l'AMF et/ou de l'AMF-R soit modifiée par les variations de pH que ces molécules subissent au cours de leurs cycles d'endocytose comme cela a été observé dans un milieu extracellulaire acide avec l'AMF (Amraei, Jia et al. 2003). Dans ce cas, le complexe AMF/AMF-R subirait plusieurs cycles d'endocytose et de recyclage avant d'adopter une conformation propice à son association avec la matrice de FN. Toutefois, les modifications subies par l'AMF dans les MVBs ne semblent pas aussi drastiques que lorsque l'AMF est directement incubé à pH5, car la nature de cette association n'est pas la même. En effet, la mesure de FRET a montré que l'association de l'AMF avec la FN était indirecte et qu'elle s'effectuait probablement via son récepteur. L'association de l'AMF à l'AMF-R semble donc très forte et protéger l'AMF des altérations possibles de sa conformation induites par l'acidification du milieu dans les MVBs. Donc, c'est peut-être l'AMF-R qui est modifié au cours des cycles d'endocytose et pas l'AMF.

L'ubiquitination des récepteurs membranaires est un mécanisme important dans la régulation de l'endocytose et dans le ciblage des récepteurs vers la voie de recyclage ou la voie de dégradation (Haglund, Di Fiore et al. 2003; Wojcikiewicz 2004). L'AMF-R est un récepteur ubiquitiné (Fang, Ferrone et al. 2001; Registre, Goetz et al. 2004). Il serait très intéressant d'étudier si l'AMF-R est ubiquitiné au

moment de son endocytose par la voie dépendante des vésicules de clathrine et si son niveau d'ubiquitination contrôle son recyclage et/ou son association avec la matrice de FN.

2.3 L'association de l'AMF en présence d'héparane sulfate

Les HSPGs lient une grande variété de cytokines et de facteurs de croissance dont ils régulent l'activité (Nugent and Iozzo 2000; Turnbull, Powell et al. 2001). L'HS induit la séquestration de cytokines dans la MEC et lie les sites matricryptiques de la FN (Vlodavsky, Miao et al. 1996; Homandberg, et al. 1985) (Homandberg, Williams et al. 1985).

Des études récentes ont montré que l'acidification du milieu extracellulaire augmente la liaison de VEGF à la matrice de FN via sa liaison aux HSPGs (Goerges and Nugent 2003; Goerges and Nugent 2004). Le VEGF qui est libéré, lorsque le pH redevient normal, conserve ses propriétés cytokines sur les cellules endothéliales (Goerges and Nugent 2004). L'augmentation de la liaison de VEGF à la MEC démontre qu'à pH acide, la MEC pourrait servir à stocker ce facteur angiogénique, dans des sites spécifiques qui demandent la formation de nouveaux vaisseaux.

Nous avons étudié le rôle de l'HS dans la liaison de l'AMF à la FN en fonction du pH. Nous avons constaté que l'HS n'a aucun effet sur l'endocytose et sur l'association de l'AMF à la FN à pH neutre. Par contre, à pH acide, l'HS augmente l'association de l'AMF à la matrice de FN et à la surface des cellules.

2.3.1 La matrice de fibronectine sert de site de stockage de l'AMF

L'acidification du milieu extracellulaire augmente considérablement l'association de l'AMF avec la matrice de FN. La FN pourrait participer directement à

l'angiogénèse via sa liaison sensible au pH à l'AMF et au VEGF. On pourrait imaginer qu'à pH acide, la matrice de FN sert de site de stockage de l'AMF et limite son action cytokine et angiogénique paracrine pour pouvoir ensuite la libérer lorsque le pH redevient normal comme c'est le cas de VEGF (Goerges and Nugent 2003; Goerges and Nugent 2004). Cette association pourrait protéger l'AMF de la dégradation comme c'est le cas pour d'autres cytokines qui se lient aux HSPGs (Ruoslahti, Yamaguchi et al. 1992; Vlodavsky, Miao et al. 1996).

Est-ce que cette association est réversible lorsque le pH extracellulaire revient à la normale? Est-ce que l'AMF libérée par la matrice de FN est toujours active? Est-ce qu'elle retrouve sa conformation? Est-elle à nouveau capable de stimuler la motilité et la croissance des cellules de façon autocrine et paracrine?

Nous avons déjà observé que l'AMF-Alexa568 liée à la matrice de FN à pH5 se détachait de la matrice quand le pH redevenait normal (Amraei, Jia et al. 2003). Il serait intéressant de préincuber les cellules traitées avec l'HS en présence d'AMF-Alexa568 à pH5, puis de changer le milieu pour éliminer l'AMF non incorporée dans la MEC et de réincuber les cellules à pH neutre. Si la matrice de FN protège l'AMF de la dégradation induite par l'acidification, l'AMF stockée dans la matrice pourrait à nouveau s'associer en dimère, être endocytée par les cellules par la voie dépendante des clathrines et stimuler leur motilité. Cette expérience devrait être faite dans les cellules FN^{+/+} et FN^{-/-} pour déterminer le rôle exacte de la matrice de FN dans la séquestration de l'AMF.

2.3.2 L'héparane sulfate favorise l'association de l'AMF à la membrane plasmique des cellules

La préincubation des cellules en présence d'HS à pH acide induit la formation d'un marquage ponctuel de l'AMF à la surface des cellules. Ce marquage ne dépend pas de l'expression de la FN car il s'observe aussi bien dans les cellules NIH-3T3 que dans les cellules FN^{-/-}. De nombreuses études tendent à démontrer que la membrane plasmique des cellules est composée de domaines qui diffèrent par la nature de leurs phospholipides (Anderson and Jacobson 2002; Nabi and Le 2003; Chamberlain 2004). Ces domaines, ou radeaux lipidiques, dont font partie les cavéoles, concentrent beaucoup de protéines impliquées dans les mécanismes de signalisation cellulaire (Morris, Cox et al. 2004). Le marquage ponctuel de l'AMF pourrait signifier que dans ces conditions, la liaison de l'AMF à l'HS concentre l'AMF au niveau de domaines membranaires particuliers.

Il existe deux grands types d'HSPG exprimés à la surface des cellules, les syndécans qui possèdent un noyau protéique transmembranaire et des glypicans qui sont liés à la membrane plasmique par un GPI (Bernfield, Gotte et al. 1999). Le syndécan-4 serait impliqué dans le ciblage de FGF-2 au niveau de radeaux lipidiques non marqués par la cavéoline (Tkachenko and Simons 2002).

Il serait intéressant de déterminer si la cavéoline et la flotiline, qui sont les marqueurs des cavéoles, sont concentrés dans ces régions marquées par l'AMF et à quel type de HSPG se lie l'AMF. L'isolation biochimique des radeaux lipidiques permettrait de vérifier ces hypothèses. Nous n'avons pas quantifié d'augmentation de la voie d'endocytose des vésicules recouvertes de clathrine en présence d'HS, toutefois nous n'avons pas étudié la voie des cavéoles dans ces conditions. Il serait intéressant de quantifier si l'ajout de HS module le recrutement et l'endocytose du complexe AMF/AMF-R par la voie des cavéoles vers le REL.

2.3.3 Les molécules de liaison de l'AMF

Le triple marquage de l'AMF, de l'AMF-R et de la matrice de FN a souvent été observé à la surface des cellules NIH-3T3 en microscopie à fluorescence et confocale (Le, Benlimame et al. 2000). Toutefois, il est impossible de dire s'il n'existe pas d'autres protéines impliquées dans le complexe AMF/AMF-R/FN.

L'*Insulin-like growth factor* (IGF) est un facteur important pour la croissance, la différenciation et la prolifération des cellules (Jones and Clemmons 1995). L'*insulin-like growth factor binding protein-3* (IGFBP-3) est la protéine de liaison à l'IGF, la plus abondante dans le sérum humain (De Mellow and Baxter 1988; Jones and Clemmons 1995; Ali, Cohen et al. 2003). Elle inhibe la croissance et induit l'apoptose des cellules (Ali, Cohen et al. 2003). Une étude récente a montré que l'AMF pouvait se lier à l'IGFBP-3 et que cette liaison inhibe l'activité cytokine de l'AMF en faisant probablement compétition au niveau de la liaison avec son récepteur, l'AMF-R (Mishra, Raz et al. 2004). L'IGFBP-3 est une protéine qui se lie à la FN (Gui and Murphy 2001). L'IGFBP-3 pourrait lier directement l'AMF à la matrice de FN et l'empêcher d'interagir avec son récepteur. Cette protéine pourrait donc réguler l'activité de l'AMF comme elle le fait avec l'IGF (Ali, Cohen et al. 2003).

L'IGFBP-3 possède un site de liaison à l'HS mais elle n'interagit pas directement avec les HSPGs présents à la surface des cellules en conditions physiologiques (Yang, Yanagishita et al. 1996). De plus, elle augmente l'association de l'IGF-I à la surface des cellules à pH acide (Forsten, Akers et al. 2001). Il serait intéressant d'étudier si l'IGFBP-3 est impliqué dans l'association de l'AMF aux HSPGs exprimés à la surface des cellules à pH acide.

La fabrication d'une protéine de fusion de l'AMF, l'AMF-His, où l'AMF serait associée avec un peptide de polyhistidine qui peut être isolé sur une colonne d'affinité de nickel, pourrait augmenter l'efficacité de purification de l'AMF et des protéines qui y sont associées. L'association du complexe protéique pourrait être stabilisée avec des *crosslinkers*.

L'isolement biochimique des protéines associées avec l'AMF par co-immunoprécipitation ou sur colonne d'affinité pourrait permettre de vérifier si à pH neutre l'association de l'AMF avec la FN s'effectue vraiment via son récepteur, si l'IGFBP-3 lie l'AMF à la matrice de FN ou si les quatre protéines se regroupent dans un même complexe protéique. De plus, cette étude permettrait d'isoler et d'identifier l'HSPG qui se lie à l'AMF et de vérifier si l'association de l'AMF avec la FN est vraiment directe à pH acide.

L'étude des différentes molécules de liaison de l'AMF pourrait permettre de mettre en évidence des modes de régulation de l'activité cytokine de l'AMF.

3 LE REMODELAGE DE LA MATRICE DE FIBRONECTINE PAR MGAT5 ET LA GALECTINE-3

L'expression de *Mgat5* et de la galectine-3 est impliquée dans la régulation de l'adhésion et de la motilité des cellules et dans la progression tumorale (Fernandes, Sagman et al. 1991; Dennis, Granovsky et al. 1999; Granovsky, Fata et al. 2000; Nangia-Makker, Honjo et al. 2000; Takenaka, Fukumori et al. 2004). Les cellules tumorales épithéliales mammaires exprimant ou non le gène *Mgat5* que nous avons utilisées dans notre étude, ont été obtenues à partir du croisement des souris *Mgat5*^{-/-} et *Mgat5*^{+/+} avec des souris transgéniques exprimant le virus PyMT. Le phénotype a été rétabli dans les cellules *Mgat5* *rescue* en infectant les cellules PyMT *Mgat5*^{-/-} avec un rétrovirus codant pour le gène *Mgat5*.

L'étude de ces trois lignées cellulaires nous a permis de démontrer que l'expression de *Mgat5* et de la galectine-3 était impliquée dans l'expression et le remodelage de la matrice de FN et la régulation de la motilité cellulaire, d'une manière dépendante de l'activité de la PI3-K.

L'absence de fibrillogénèse de la FN observée chez les cellules *Mgat5*^{-/-} et les résultats obtenus après le traitement des cellules *Mgat5* de type sauvage et *Mgat5* *rescue* avec la swainsonnine et le β -lactose, ont mis en évidence que la galectine-3 stimulait le remaniement de la matrice de FN via la liaison de son domaine CRD aux groupements polylactosamines d'une ou de plusieurs protéines cibles à la surface des cellules.

3.1 Quelles sont les protéines cibles de la galectine-3?

La Galectine-3 se lie au motif Gal β 1,4GlcNAc β 1,3 contenu dans les branchements poly-N-acetylactosamine qui sont ajoutés à la surface des protéines

(Hirabayashi, Hashidate et al. 2002). Mgat5 est une enzyme clé de la maturation des N-glycans qui permet l'élongation de ces groupements (Yousefi, Higgins et al. 1991).

Les récentes études sur la fibrillogénèse de la FN ont montré que l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ et le syndécan-4 étaient deux récepteurs membranaires très importants pour la fibrillogénèse de la FN (Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer 2003). Il est donc possible que la galectine-3 se lie à l'une ou l'autre de ces protéines pour stimuler le remodelage de la matrice de FN.

3.1.1 Est-ce que la galectine-3 se lie à l'intégrine $\beta 1$?

Nous avons regardé si l'intégrine $\beta 1$ et la FN pouvaient être les cibles de la galectine-3. L'intégrine $\beta 1$ et la FN ont été immunoprécipitées avec des anticorps spécifiques dirigés contre ces protéines et avec la lectine leucoagglutinine liée à des billes d'agarose, la LPHA-agarose, qui est une lectine de plante qui lie spécifiquement les groupements polylactosamines ajoutés par l'activité enzymatique du produit du gène Mgat5. Ces études ont montré que ces deux protéines portaient des groupements polylactosamines lorsqu'elles étaient exprimées par les cellules Mgat5 de type sauvage et Mgat5 *rescue*. Le syndécan-4 porte deux sites possibles de N-glycosylation (Mali, Jaakkola et al. 1990; Baci, Acaster et al. 1994). Il serait intéressant d'effectuer la même étude avec le syndécan-4.

Une analyse par western blot a montré que la FN commerciale que nous avons utilisée pour préparer les substrats de FN ne portait pas de groupement polylactosamine. Nous avons au préalable déterminé qu'en absence de sérum les cellules Mgat5 de type sauvage et Mgat5 *rescue* n'exprimaient pas la FN à leur surface. Il est fort possible que l'expression des groupements polylactosamines de la

FN ne soit pas un élément critique pour le remaniement de la matrice de la FN induite par la galectine-3. Toutefois, il serait intéressant de vérifier si le substrat de FN ne pourrait pas stimuler l'expression et la sécrétion de la FN endogène par les cellules de type sauvage. D'autant plus que la galectine-3 stimule la migration des cellules uniquement lorsque les cellules sontensemencées sur un substrat de FN et qu'aucune stimulation n'est mesurée lorsque les cellules sontensemencées directement sur le plastique. Cette FN nouvellement synthétisée, et exprimant des groupements polylactosamine, pourrait alors interagir avec la galectine-3.

Les galectines peuvent se lier directement aux intégrines (Ochieng, Leite-Browning et al. 1998; Hadari, Arbel-Goren et al. 2000) et les intégrines doivent être dans une conformation activable pour lier les molécules de la MEC (Calderwood 2004). Une étude récente suggère que l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ liée à la FN au niveau des fibrilles d'adhésion adopterait une conformation particulière différente de celle adoptée au niveau des contacts focaux et que la stabilisation de cette conformation favoriserait la fibrillogenèse de la FN (Clark, Pankov et al. 2005). La liaison des galectines au niveau du domaine extracellulaire de l'intégrine pourrait stabiliser les intégrines dans une conformation active particulière comme elle le fait avec le TCR des cellules T du système immunitaire (Demetriou, Granovsky et al. 2001). Le maintien de cette conformation favoriserait la migration cellulaire et le remodelage de la matrice de FN.

L'étude de l'expression de l'intégrines $\beta 1$ en immunofluorescence a montré que l'intégrine $\beta 1$ n'était pas concentrée au niveau des contacts focaux des cellules *Mgat5^{-/-}* (voir figure supplémentaire). Nous avons donc analysé la localisation de

l'intégrine- $\beta 1$ dans les cellules Mgat5 de type sauvage ensemencées sur un substrat de FN. Nous avons constaté que l'intégrine $\beta 1$ était localisée au niveau des contacts focaux d'adhésion marqués avec la paxilline et la vinculine et que le traitement des cellules avec la swainsonine et le β -lactose, qui inhibaient le remodelage de la matrice de FN, n'avait aucun effet mesurable sur la localisation des intégrines. La liaison de la galectine-3 au niveau des groupements polylactosamines ne semble donc pas nécessaire pour le recrutement de l'intégrine- $\beta 1$ au niveau des contacts focaux.

Nous n'avons peut-être pas utilisé la meilleure technique pour déterminer si la galectine-3 module l'activité et/ou le recrutement des intégrines au niveau des contacts focaux. L'utilisation d'anticorps dirigés contre la forme activée de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dont l'expression pourrait être analysée avec la technique de FACs (*Flow cytometry assays*) pourrait permettre de déterminer si la galectine-3 stabilise ou module l'activation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Les mesures du remaniement de la matrice de FN pourraient également être effectuées en présence d'EDTA (un chélateur de cations bivalents indispensables à l'activité des intégrines) et d'anticorps activateurs ou inhibiteurs de l'activité des intégrines pour déterminer si la modulation de l'activité des intégrines affecte le remodelage de la matrice de FN induite par la galectine-3.

3.1.2 Autres protéines cibles possibles pour la galectine-3

Il existe de nombreuses protéines qui expriment le motif Gal $\beta 1,4$ GlcNAc $\beta 1,3$ auxquelles pourrait venir se lier la galectine-3. La galectine-3 se lie à la molécule de surface CD98 (Dong and Hughes 1997) impliquée dans le regroupement des intégrines à la surface des cellules (Fenczik, Sethi et al. 1997). De plus, une étude

récente a montré que la galectine-3 pouvait se lier et réguler l'activité de EGF-R et T β RII (Partridge, Le Roy et al. 2004). Or, il existe une coopérativité croisée entre les voies de signalisation des intégrines et des récepteurs des facteurs de croissance (Schwartz, Schaller et al. 1995; Schwartz and Ginsberg 2002). L'augmentation de l'expression en surface des intégrines induite par l'activation de CD98 et l'activation de certains récepteurs de facteur de croissance pourraient également favoriser le remodelage de la matrice de FN.

3.2 Quel est le rôle du RGD ?

Le RGD est un peptide qui fait compétition avec la liaison de la plupart des intégrines au niveau de la FN (Ruoslahti and Pierschbacher 1987) et qui induit l'adhésion des cellules quand il est immobilisé sur un substrat (Hersel, Dahmen et al. 2003). Nous avons observé que le traitement des cellules Mgat5 de type sauvage avec le RGD inhibait la motilité et le remaniement de la matrice de FN. Toutefois, lorsque nous avons coincubé les cellules en présence à la fois de galectine-3 et de RGD (galectine-3/RGD) nous n'avons pas observé d'inhibition de la motilité et du remaniement de la matrice induite par la galectine-3, nous avons même plutôt observé une augmentation du remaniement de la matrice de FN. L'ambiguïté de la relation entre les galectines et le peptide RGD avait déjà été observée avec la galectine-8 (Levy, Arbel-Goren et al. 2001). Nous avons proposé que la galectine-3 pourrait stabiliser l'intégrine dans une conformation activée. Il est possible que l'action combinée du peptide RGD sur la liaison des intégrines à la MEC et la stabilisation d'une certaine conformation de l'intégrine par la galectine-3 permette à l'intégrine d'obtenir une conformation optimale pour son action sur la matrice de FN.

Toutefois nous n'avons pas observé d'augmentation de la motilité des cellules par l'ajout de gal/RGD comparé à l'effet de gal seul. Donc il est fort possible que l'effet de la galectine-3 sur le remaniement de la matrice et la motilité des cellules soit indépendant du RGD.

Le rapport entre l'adhésion et la motilité des cellules suit une courbe en cloche (Holly, Larson et al. 2000). L'augmentation du remaniement de la matrice de FN pourrait aussi être le résultat de l'équilibre entre l'activation des intégrines induite par la galectine-3 et leur inhibition par le peptide RGD.

L'activation des intégrines par la FN et la fibrillogénèse de la matrice de FN peuvent avoir lieu de façon indépendante du RGD (Sechler, Cumiskey et al. 2000; Sottile, Hocking et al. 2000). L'intégrine $\alpha 4 \beta 1$ stimule le remaniement de la matrice de FN de façon indépendante du RGD (Sechler, Cumiskey et al. 2000). Il serait intéressant d'étudier son expression dans les cellules PyMT Mgat5 et de déterminer si cette intégrine pourrait être la cible de la galectine-3.

La co-immunoprécipitation de la galectine-3 et de l'intégrine $\beta 1$ pourrait confirmer si les deux protéines interagissent ensemble et si l'ajout de RGD module cette interaction. L'étude de la fraction des protéines de surface isolées avec le LPHA-agarose sur un gel à deux dimensions permettrait d'identifier d'autres protéines cibles possibles de la galectine-3 qui pourraient être impliquées dans le remaniement de la matrice de FN.

3.3 La galectine-3 stimule la motilité cellulaire et le remodelage de la matrice de FN via l'activation de la PI3-K

La motilité et le remaniement de la matrice de FN sont deux mécanismes liés. D'une part, les cellules remanient le substrat de FN au cours de leurs

déplacements et d'autre part, la matrice organisée de FN favorise la motilité des cellules. La FAK est une tyrosine kinase qui joue un rôle important dans l'adhésion et la migration cellulaire (Schlaepfer and Hunter 1998). Une étude récente a montré que la FAK est une protéine clé de la fibrillogénèse de la FN (Ilic, Kovacic et al. 2004). Le recrutement des intégrines au niveau des contacts focaux d'adhésion induit l'autophosphorylation de la FAK sur son résidu tyr-397 (Schaller, Borgman et al. 1992; Schaller and Parsons 1994). La phosphorylation de la tyr-397 va permettre la liaison et l'activation d'effecteurs liés à la migration cellulaire comme p130cas et PI3-K (Chen and Guan 1994; Chen, Appeddu et al. 1996). L'activation de la PI3-K pourra ensuite mener à la stimulation des petites GTPase de la famille Rho liées au réarrangement du cytosquelette d'actine (Shaw, Rabinovitz et al. 1997; Krugmann, Williams et al. 2004; Saci and Carpenter 2005; Leever, Vanhaesebroeck et al. 1999). La PI3-K est également impliquée dans l'activation de la sérine/thréonine kinase Akt/PKB (King, Mattaliano et al. 1997; Keely et al. 1997; Sonoda, Matsumoto et al. 2000; Keely, Westwick et al. 1997). L'activation de Akt/PKB est généralement liée à la régulation de l'apoptose et à la prolifération cellulaire (Downward 2004). Son rôle dans la migration a toutefois été observé via l'activation de ILK et de certains facteurs de croissance (Morales-Ruiz, Fulton et al. 2000; Higuchi, Masuyama et al. 2001; Qian, Zhong et al. 2005).

L'inhibition de la migration et du remaniement de la matrice de FN par le traitement des cellules avec LY294002 montre l'importance de la PI3-K dans la voie de stimulation de la galectine-3. La perte de la voie de la PI3-K avait déjà été observée dans les cellules *Mgat5*^{-/-} (Granovsky, Fata et al. 2000). Cette implication pourrait être confirmée par l'utilisation d'un autre inhibiteur comme la wortmanine ou par l'expression de protéines recombinantes dominantes négative de la PI3-K.

Nous avons observé que le traitement des cellules Mgat5 de type sauvage avec la galectine-3 induit la phosphorylation de la FAK sur la tyr-397 mais que cette stimulation n'est pas inhibée par LY294002. Ce résultat suggère que la FAK est activé via l'interaction de la galectine-3 avec les intégrines de façon indépendante de la PI3-K à moins que la PI3-K ne soit un effecteur de la FAK. L'ajout de RGD n'a aucun effet sur la stimulation de la FAK par la galectine-3 ce qui appuie le raisonnement selon lequel ce mécanisme serait indépendant du RGD.

La phosphorylation de Akt sur la sérine 473 est essentiellement stimulée par la galectine-3/RGD et inhibée par la PI3-K. L'activation de la voie PI3-K/Akt/PKB semble donc être indépendante la voie de stimulation de la FAK. La galectine-3 peut se lier à différents substrats à la surface des cellules, elle se lie aux intégrines mais aussi à différents récepteurs membranaires (Ochieng, Leite-Browning et al. 1998; Hadari, Arbel-Goren et al. 2000; Demetriou, Granovsky et al. 2001; Partridge, Le Roy et al. 2004). Les données que nous observons pourraient être le résultat de différentes voies de signalisation croisées. Toutefois, le rôle exact de la FAK et de Akt dans les voies de stimulation de la galectine-3 reste encore à être étudié et confirmé.

La galectine-8 est une protéine qui lie les intégrines et qui module l'adhésion des cellules via l'activation de la FAK et de la paxilline (Levy, Arbel-Goren et al. 2001; Zick, Eisenstein et al. 2004). Les auteurs ont suggéré que l'effet régulateur de l'adhésion de la galectine-8 s'effectuait via sa liaison aux intégrines même si elle est indépendante du traitement des cellules avec le RGD (Zick, Eisenstein et al. 2004). Il est donc probable que la galectine-3 agisse comme la galectine-8 via l'activation des intégrines mais le mécanisme exact reste à être déterminé.

3.4 La fibrillogénèse de la FN versus le remodelage de la matrice de la FN.

La fibrillogénèse de la FN semble essentiellement être le résultat de la formation et de la dynamique des structures d'adhésion à la surface des cellules, dépendre du sérum et de l'adhésion cellulaire plus que de la migration (Zhang, Checovich et al. 1994; Wu, Keivens et al. 1995; Zhang, Magnusson et al. 1997; Zhong, Chrzanowska-Wodnicka et al. 1998; Pankov, Cukierman et al. 2000; Zamir and Geiger 2001; Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer 2003). A l'inverse, le remodelage de la matrice de FN semble découler plutôt de l'équilibre entre la dégradation de la matrice et la migration cellulaire qui est elle-même favorisée par l'organisation de la matrice (Hynes 1999; Ohashi, Kiehart et al. 1999). Il est certain que les deux mécanismes nécessitent l'interaction des cellules avec la MEC via les intégrines et peut-être d'autres récepteurs membranaires comme les syndécans, mais les voies de signalisation impliquées sont peut-être plus différentes que l'on pense.

Nous avons étudié la fibrillogénèse de la FN dans les cellules NIH-3T3 et nous avons observé que le traitement des cellules avec l'AMF et l'endocytose du complexe AMF/AMF-R n'avaient pas d'effet sur la fibrillogénèse des cellules NIH-3T3. L'inhibition des voies d'endocytose par les formes dominantes négatives de la dynamine et de la clathrine n'affectait pas, non plus, la formation des fibrilles de FN à la surface des cellules.

Le laboratoire du Dr Silletti a étudié les effets de l'AMF sur le remaniement de la matrice de FN (Silletti, Paku et al. 1998; Silletti, Paku et al. 1998). Pour leur étude, ils avaient utilisé deux lignées de cellules de mélanome murin plus ou moins

malignes, les cellules K1735 M1 (très métastatiques) et les cellules C111 (beaucoup moins métastatiques). Il avaient observé que l'AMF activait la dégradation de la matrice de FN chez les cellules les plus métastatiques et le remodelage de la matrice de FN dans les cellules C111. Cette stimulation était spécifique de la FN et n'avait pas lieu sur un substrat de collagène ou de laminine. L'AMF semble donc stimuler le remodelage de la matrice sans agir sur la fibrillogénèse de la FN elle-même. Le même paradoxe a été observé dans le cas de la galectine-3.

L'étude des cellules épithéliales mammaires PyMT Mgat5 a montré que la liaison de la galectine-3 aux branchements polylactosamines des protéines exprimées à la surface des cellules stimule le remodelage de la matrice de FN via la stimulation de la motilité, de la FAK et de la PI3-K dans des conditions de privation de sérum, qui inhibent la fibrillogénèse de la FN.

Les tumeurs constituent un environnement hypoxique et acide dépourvu en sérum (Wike-Hooley, Haveman et al. 1984; Wike-Hooley, Van der Zee et al. 1984). La migration et le remodelage de la MEC sont des éléments clés dans la métastase (Meredith, Fazeli et al. 1993; Stetler-Stevenson, Liotta et al. 1993; Akiyama, Olden et al. 1995; MacDougall and Matrisian 1995; Price, Bonovich et al. 1997; Voura, Sandig et al. 1998).

L'hypoxie et l'acidification du milieu favorisent l'expression de l'AMF et sa liaison à la matrice de FN (Yoon, Buchler et al. 2001). De plus, la surexpression de l'AMF est associée avec l'activation de la motilité et de la voie Akt/PKB qui protège les cellules privées de sérum de l'apoptose (Tsutsumi, Hogan et al. 2003).

La galectine-3 et l'AMF sont deux facteurs importants dans la progression tumorale qui sont impliqués, entre autre, dans la stimulation de la motilité cellulaire, la métastase, l'angiogénèse et l'apoptose (Hirono, Fushida et al. 1996; Nangia-

Makker, Honjo et al. 2000; Torimura, Ueno et al. 2001; Yoon, Buchler et al. 2001; Van Den Brule, Califice et al. 2002; Haga, Funasaka et al. 2003; Tsutsumi, Hogan et al. 2003; Takenaka, Fukumori et al. 2004). L'interaction des cellules à la MEC est également impliquée dans ces mécanismes (Akiyama, Olden et al. 1995).

Les voies de signalisation reliées aux structures d'adhésion ont été très étudiées dans les cellules en culture (Perillo, Marcus et al. 1998; Zamir, Katz et al. 1999; Geiger and Bershadsky 2001; Geiger, Bershadsky et al. 2001; Zamir and Geiger 2001). Des études récentes effectuées sur des cellules cultivées dans des matrices en trois dimensions ont révélé, que dans des conditions qui se rapprochent du vivant, la formation et les modes d'activation des structures d'adhésion étaient un peu différents (Cukierman, Pankov et al. 2001; Cukierman, Pankov et al. 2002).

Il serait intéressant d'étudier le rôle de l'AMF et de la galectine-3 dans le remodelage de la matrice de FN par des cellules tumorales cultivées en trois dimensions dans des conditions acides et faibles en sérum et de regarder tout particulièrement l'activation de la PI3-K. Cette étude permettrait de mieux comprendre le rôle de l'AMF et de la galectine-3 dans les étapes précoces du processus métastatique, lorsque les cellules tumorales migrent à travers la MEC et quittent la tumeur primaire.

CONCLUSION

L'AMF/PGI et la galectine-3 sont deux protéines fortement exprimées par les cellules tumorales (Liotta, Mandler et al. 1986; Watanabe, Takehana et al. 1996; Takenaka, Fukumori et al. 2004) et sécrétées par une voie non classique de sécrétion (Sato, Burdett et al. 1993; Niinaka, Paku et al. 1998). Bien que la voie de sécrétion de la galectine-3 soit maintenant assez bien comprise, celle de l'AMF/PGI soulève toujours beaucoup d'interrogation. L'étude de la surexpression d'une protéine de fusion de l'AMF/PGI, l'AMF/PGI-HA, a permis de déterminer que le niveau de sécrétion de l'AMF/PGI-HA était assez faible par rapport à l'expression totale de l'AMF/PGI ce qui suggère que ce mécanisme est fortement régulé par les cellules. La sécrétion de l'AMF/PGI est un mécanisme important car il permet à l'AMF/PGI d'acquérir ses propriétés de cytokine, d'où l'intérêt de poursuivre les études dans ce domaine.

L'augmentation de la glycolyse est associée à la progression tumorale (Mathupala, Rempel et al. 1997; Gatenby and Gillies 2004; Zu and Guppy 2004). L'AMF/PGI, la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la lactate déshydrogénase sont surexprimées par les cellules tumorales et fortement exprimées dans le sérum de patients atteints du cancer (Bodansky 1954; Nagy and Macleod 1979; Szeinfeld 1989; Baumann, Kappel et al. 1990; Guirguis, Javadpour et al. 1990; Dimopoulos, Barlogie et al. 1991 ; Jurisic, Konjevic et al. 2004). L'étude de l'expression de l'AMF/PGI-HA a montré que cette activité glycolytique favorisait la formation des pseudopodes et des lamellipodes des cellules motiles. Ce résultat confirme le rôle

de l'augmentation du métabolisme dans la motilité et l'invasion des cellules tumorales (Gatenby and Gillies 2004).

Contrairement aux collagènes ou aux protéoglycans qui se polymérisent spontanément en solution, la matrice de FN est entièrement générée par l'activité des cellules (Hynes 1999; Ohashi, Kiehart et al. 1999). Cette matrice très élastique joue un rôle important dans la motilité et la survie des cellules tumorales (Ohashi, Kiehart et al. 1999).

Nous avons observé que l'association de l'AMF/PGI aux fibrilles de FN ne jouait aucun rôle dans la fibrillogénèse de la FN et que les fibrilles de FN maintenaient l'AMF/PGI et son récepteur à la surface des cellules, ce qui suggère que les fibrilles d'adhésion de FN qui se forment à la surface des cellules pourraient peut-être jouer un rôle dans la régulation de l'activité de l'AMF/AMF-R.

De plus, nous avons démontré que la galectine-3, dont le rôle à la fois activateur et l'inhibiteur de l'adhésion et de la motilité des cellules tumorales n'est pas encore vraiment compris (Van Den Brule, Califice et al. 2002), était impliquée dans le remodelage de la matrice de FN. L'expression de la FN varie entre les cellules tumorales, certaines cellules ont perdu l'expression de la FN alors que d'autres cellules la surexpriment (Mautner and Hynes 1977; Akamatsu, Ichihara-Tanaka et al. 1996; Taverna, Ullman-Cullere et al. 1998; Wu, Keightley et al. 1998). Ces résultats pourront peut-être expliquer ambivalence de la fonction des galectines dans l'adhésion et la motilité des cellules tumorales.

La MEC et les HSPGs exprimés dans la MEC et à la surface des cellules concentrent et régulent l'activité de nombreux facteurs de croissance et

angiogéniques (Vlodavsky, Bar-Shavit et al. 1991; Vlodavsky, Miao et al. 1996; Bernfield, Gotte et al. 1999; Elkin, Ilan et al. 2001; Kramer and Yost 2003). Des études récentes ont montré que l'AMF/PGI possédait des propriétés paracrine angiogéniques (Funasaka, Haga et al. 2001). L'observation de la séquestration de l'AMF/PGI, dépendante de l'acidification du pH, au niveau de la matrice de FN et des HSPGs exprimés à la surface des cellules appuie l'importance de l'AMF/PGI dans l'angiogenèse.

Notre étude a montré que l'AMF/PGI et la galectine-3 interagissent avec la FN de deux façons différentes. L'AMF/PGI s'associe avec son récepteur à la matrice de FN alors que la galectine-3 régule la formation de fibrilles de FN dans la MEC. Ces travaux ont mis en évidence l'importance et la complexité du rôle de l'interaction des cellules tumorales avec la matrice de FN dans la progression du cancer et la formation de métastases.

PERSPECTIVES

La mise en évidence du rôle de la galectine-3 dans le remaniement de la matrice de FN démontre une nouvelle fonction très intéressante pour cette lectine dans la migration des cellules tumorales. Cette fonction pourrait peut-être expliquer le rôle parfois activateur ou inhibiteur de la galectine-3 dans l'adhésion et la motilité des cellules tumorales. Toutefois, cette étude n'en est qu'à son début, les protéines cibles auxquelles se lie la galectine-3, pour favoriser le remodelage de la matrice de FN, et les mécanismes moléculaires impliqués restent encore à être déterminés.

L'association de l'AMF/AMF-R aux fibrilles de FN à la surface des cellules et de l'AMF à la matrice de FN et aux HSPGs, à pH acide, suggère l'importance du rôle de la matrice de FN dans la régulation de la fonction de l'AMF/PGI et de l'AMF-R. Il serait très intéressant de déterminer si l'AMF-R associé à la matrice de FN avec son ligand est effectivement maintenu dans un état activé et quel est le rôle exact de cette liaison.

Il serait également intéressant de déterminer si, *in vivo*, la matrice de FN sert de site de stockage et de séquestration pour l'AMF et si ce mécanisme est impliqué dans les propriétés angiogéniques de l'AMF/PGI. Les travaux sur les fonctions angiogéniques de l'AMF/PGI pourraient également être effectués dans des conditions d'acidité et d'hypoxie qui seraient plus proche d'un environnement tumoral.

Ce travail a permis de mettre en évidence que même si cette protéine a été très étudié depuis presque 30 ans tout n'est pas encore connue sur la FN d'où l'importance de poursuivre les études du rôle de la MEC de FN dans la métastase.

BIBLIOGRAPHIE

Abdel-Nabi, I. M., A. M. Kadry, et al. (1992). "Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of benzophenone-3 in rats." J Appl Toxicol **12**(4): 255-9.

Abercrombie, M., J. E. M. Heaysman, et al. (1970). "The locomotion of fibroblasts in culture. III. Movement of particles on the dorsal surface of the leading lamella." Experimental Cell Research **62**: 389-98.

Akahani, S., P. Nangia-Makker, et al. (1997). "Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family." Cancer Res **57**(23): 5272-6.

Akamatsu, H., K. Ichihara-Tanaka, et al. (1996). "Suppression of transformed phenotypes of human fibrosarcoma cells by overexpression of recombinant fibronectin." Cancer Res **56**(19): 4541-6.

Akiyama, S. K., K. Olden, et al. (1995). "Fibronectin and integrins in invasion and metastasis." Cancer Metastasis Rev **14**(3): 173-89.

Ali, O., P. Cohen, et al. (2003). "Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule." Horm Metab Res **35**(11-12): 726-33.

- Almkvist, J. and A. Karlsson (2004). "Galectins as inflammatory mediators." Glycoconj J **19**(7-9): 575-81.
- Altankov, G. and F. Grinnell (1993). "Depletion of intracellular potassium disrupts coated pits and reversibly inhibits cell polarization during fibroblast spreading." Journal of Cell Biology **120**: 1449-59.
- Altschuler, Y., S. M. Barbas, et al. (1998). "Redundant and distinct functions for dynamin-1 and dynamin-2 isoforms." J Cell Biol **143**(7): 1871-81.
- Altschuler, Y., S. Liu, et al. (1999). "ADP-ribosylation factor 6 and endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells." J Cell Biol **147**(1): 7-12.
- Amraei, M., Z. Jia, et al. (2003). "Acid-induced conformational changes in phosphoglucose isomerase result in its increased cell surface association and deposition on fibronectin fibrils." J Biol Chem **278**(40): 38935-41.
- Amraei, M. and I. R. Nabi (2002). "Species specificity of the cytokine function of phosphoglucose isomerase." FEBS Lett **525**(1-3): 151-5.
- Anderson, R. G. and K. Jacobson (2002). "A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains." Science **296**(5574): 1821-5.

- Angers-Loustau, A., J. F. Cote, et al. (1999). "Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts." J Cell Biol **144**(5): 1019-31.
- Aniento, F., N. Emans, et al. (1993). "Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes." Journal of Cell Biology **123**: 1373-87.
- Arihiro, K., K. Inai, et al. (1993). "Distribution of laminin, type IV collagen and fibronectin in the invasive component of breast carcinoma." Acta Pathol Jpn **43**(12): 758-64.
- Arsenieva, D., R. Hardre, et al. (2002). "The crystal structure of rabbit phosphoglucose isomerase complexed with 5-phospho-D-arabinonohydroxamic acid." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 5872-7.
- Asada, M., K. Furukawa, et al. (1991). "Structural study of the sugar chains of human leukocyte cell adhesion molecules CD11/CD18." Biochemistry **30**(6): 1561-71.
- Baciu, P. C., C. Acaster, et al. (1994). "Molecular cloning and genomic organization of chicken syndecan-4." J Biol Chem **269**(1): 696-703.
- Balsamo, J., H. Ernst, et al. (1995). "The interaction of the retina cell surface N-acetylgalactosaminylphosphotransferase with an endogenous proteoglycan

ligand results in inhibition of cadherin-mediated adhesion." J Cell Biol **129**(5): 1391-401.

Baneyx, G., L. Baugh, et al. (2001). "Coexisting conformations of fibronectin in cell culture imaged using fluorescence resonance energy transfer." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(25): 14464-8.

Barboni, E. A., S. Bawumia, et al. (2000). "Molecular modeling and mutagenesis studies of the N-terminal domains of galectin-3: evidence for participation with the C-terminal carbohydrate recognition domain in oligosaccharide binding." Glycobiology **10**(11): 1201-8.

Barboni, E. A., S. Bawumia, et al. (1999). "Kinetic measurements of binding of galectin 3 to a laminin substratum." Glycoconj J **16**(7): 365-73.

Barry, E. L. and D. F. Mosher (1989). "Factor XIIIa-mediated cross-linking of fibronectin in fibroblast cell layers. Cross-linking of cellular and plasma fibronectin and of amino-terminal fibronectin fragments." J Biol Chem **264**(7): 4179-85.

Bassell, G. and R. H. Singer (1997). "mRNA and cytoskeletal filaments." Curr Opin Cell Biol **9**(1): 109-15.

- Baumann, M. and K. Brand (1990). "Purification and characterization of phosphohexose isomerase from human gastrointestinal carcinoma and its potential relationship to neuroleukin." Cancer Research **48**: 7018-21.
- Baumann, M., A. Kappel, et al. (1990). "The diagnostic validity of the serum tumor marker phosphohexose isomerase (PHI) in patients with gastrointestinal, kidney, and breast cancer." Cancer Investigation **8**: 3510356.
- Beckerle, M. C., K. Burridge, et al. (1987). "Colocalization of calcium-dependent protease II and one of its substrates at sites of cell adhesion." Cell **51**(4): 569-77.
- Beckner, M. E., M. L. Stracke, et al. (1990). "Glycolysis as primary energy source in tumor cell chemotaxis." Journal of the National Cancer Institute **82**: 1836-40.
- Beglova, N., S. C. Blacklow, et al. (2002). "Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation." Nat Struct Biol **9**(4): 282-7.
- Benlimame, N., P. U. Le, et al. (1998). "Localization of autocrine motility factor receptor to caveolae and clathrin-independent internalization of its ligand to smooth endoplasmic reticulum." Mol Biol Cell **9**(7): 1773-86.
- Benlimame, N., D. Simard, et al. (1995). "Autocrine motility factor receptor is a marker for a distinct tubular membrane organelle." Journal of Cell Biology **129**: 459-71.

- Benmerah, A. (2004). "Endocytosis: signaling from endocytic membranes to the nucleus." Curr Biol **14**(8): R314-6.
- Bernfield, M., M. Gotte, et al. (1999). "Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans." Annu Rev Biochem **68**: 729-77.
- Beutler, E., C. West, et al. (1997). "Glucosephosphate isomerase (GPI) deficiency mutations associated with hereditary nonspherocytic hemolytic anemia (HNSHA)." Blood, Cells, Molecules, and Diseases **23**: 402-9.
- Bialkowska, K., S. Kulkarni, et al. (2000). "Evidence that beta3 integrin-induced Rac activation involves the calpain-dependent formation of integrin clusters that are distinct from the focal complexes and focal adhesions that form as Rac and RhoA become active." J Cell Biol **151**(3): 685-96.
- Bidon-Wagner, N. and J. P. Le Pennec (2004). "Human galectin-8 isoforms and cancer." Glycoconj J **19**(7-9): 557-63.
- Biederer, T., C. Volkwein, et al. (1997). "Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface." Science **278**(5344): 1806-9.
- Birdsall, B., J. Feeney, et al. (2001). "NMR solution studies of hamster galectin-3 and electron microscopic visualization of surface-adsorbed complexes: evidence for interactions between the N- and C-terminal domains." Biochemistry **40**(15): 4859-66.

- Bodansky, O. (1954). "Serum phosphohexose isomerase in cancer II. As an index of tumor growth in metastatic carcinoma of the breast." Cancer **7**: 1200-1226.
- Bonifacino, J. S. and A. M. Weissman (1998). "Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 19-57.
- Bosman, F. T. and I. Stamenkovic (2003). "Functional structure and composition of the extracellular matrix." J Pathol **200**(4): 423-8.
- Brakebusch, C., R. Grose, et al. (2000). "Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on beta 1 integrin expression on keratinocytes." Embo J **19**(15): 3990-4003.
- Bretscher, M. S. (1996). "Getting membrane flow and the cytoskeleton to cooperate in moving cells." Cell **87**: 601-6.
- Bronson, R., C. Dawe, et al. (1997). "Tumor induction by a transformation-defective polyoma virus mutant blocked in signaling through Shc." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(15): 7954-8.
- Brunner, G., J. Gabilove, et al. (1991). "Phospholipase C release of basic fibroblast growth factor from human bone marrow cultures as a biologically active complex with a phosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan." J Cell Biol **114**(6): 1275-83.

- Buck, C. A., M. C. Glick, et al. (1970). "A comparative study of glycoproteins from the surface of control and Rous sarcoma virus transformed hamster cells." Biochemistry **9**(23): 4567-76.
- Bullock, S. L., T. M. Johnson, et al. (2001). "Galectin-3 modulates ureteric bud branching in organ culture of the developing mouse kidney." J Am Soc Nephrol **12**(3): 515-23.
- Calalb, M. B., T. R. Polte, et al. (1995). "Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases." Mol Cell Biol **15**(2): 954-63.
- Calalb, M. B., X. Zhang, et al. (1996). "Focal adhesion kinase tyrosine-861 is a major site of phosphorylation by Src." Biochem Biophys Res Commun **228**(3): 662-8.
- Calderwood, D. A. (2004). "Integrin activation." J Cell Sci **117**(Pt 5): 657-66.
- Camenisch, T. D., A. P. Spicer, et al. (2000). "Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme." J Clin Invest **106**(3): 349-60.
- Cao, M. J., K. Osatomi, et al. (2000). "Purification of a novel serine proteinase inhibitor from the skeletal muscle of white croaker (*Argyrosomus argentatus*)." Biochem Biophys Res Commun **272**(2): 485-9.

- Carchon, H., E. Van Schaftingen, et al. (1999). "Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type IA (phosphomannomutase-deficiency)." Biochim Biophys Acta **1455**(2-3): 155-65.
- Cary, L. A., D. C. Han, et al. (1998). "Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration." J Cell Biol **140**(1): 211-21.
- Cary, L. A., R. A. Klinghoffer, et al. (2002). "SRC catalytic but not scaffolding function is needed for integrin-regulated tyrosine phosphorylation, cell migration, and cell spreading." Mol Cell Biol **22**(8): 2427-40.
- Chamberlain, L. H. (2004). "Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts." FEBS Lett **559**(1-3): 1-5.
- Chammas, R., N. Cella, et al. (1994). "Correspondence re: B. Fernandes et al., beta 1-6 branched oligosaccharides as a marker of tumor progression in human breast and colon neoplasia. Cancer Res., 51: 718-723, 1991." Cancer Res **54**(1): 306-8.
- Chaput, M., V. Claes, et al. (1988). "The neurotrophic factor neuroleukin is 90% homologous with phosphohexose isomerase." Nature **332**: 454-7.
- Chen, H. C., P. A. Appeddu, et al. (1996). "Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase." J Biol Chem **271**(42): 26329-34.

- Chen, H. C. and J. L. Guan (1994). "Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(21): 10148-52.
- Chiao, J. W., W. Xu, et al. (1999). "Neuroleukin mediated differentiation induction of myelogenous leukemia cells." Leuk Res **23**(1): 13-8.
- Chou, C. C., Y. J. Sun, et al. (2000). "The crystal structure of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin complexed with its carbohydrate phosphate inhibitors suggests its substrate/receptor recognition." J Biol Chem **275**(30): 23154-60.
- Chrzanowska-Wodnicka, M. and K. Burridge (1996). "Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions." J Cell Biol **133**(6): 1403-15.
- Chung, C. Y. and H. P. Erickson (1997). "Glycosaminoglycans modulate fibronectin matrix assembly and are essential for matrix incorporation of tenascin-C." J Cell Sci **110 (Pt 12)**: 1413-9.
- Clark, E. A., W. G. King, et al. (1998). "Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases." J Cell Biol **142**(2): 573-86.

- Clark, K., R. Pankov, et al. (2005). "A specific $\alpha 5 \beta 1$ -integrin conformation promotes directional integrin translocation and fibronectin matrix formation." J Cell Sci **118**(Pt 2): 291-300.
- Cobb, B. S., M. D. Schaller, et al. (1994). "Stable association of pp60src and pp59fyn with the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase, pp125FAK." Mol Cell Biol **14**(1): 147-55.
- Colnot, C., D. Fowles, et al. (1998). "Embryonic implantation in galectin 1/galectin 3 double mutant mice." Dev Dyn **211**(4): 306-13.
- Colnot, C., M. A. Ripoche, et al. (1998). "Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice." Immunology **94**(3): 290-6.
- Colognato, H. and P. D. Yurchenco (2000). "Form and function: the laminin family of heterotrimers." Dev Dyn **218**(2): 213-34.
- Cooper, D. N. and S. H. Barondes (1990). "Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism." J Cell Biol **110**(5): 1681-91.
- Cote, J. F., C. E. Turner, et al. (1999). "Intact LIM 3 and LIM 4 domains of paxillin are required for the association to a novel polyproline region (Pro 2) of protein-tyrosine phosphatase-PEST." J Biol Chem **274**(29): 20550-60.

- Couet, J., M. M. Belanger, et al. (2001). "Cell biology of caveolae and caveolin." Adv Drug Deliv Rev **49**(3): 223-35.
- Couraud, P. O., D. Casentini-Borocz, et al. (1989). "Molecular cloning, characterization, and expression of a human 14-kDa lectin." J Biol Chem **264**(2): 1310-6.
- Cukierman, E., R. Pankov, et al. (2001). "Taking cell-matrix adhesions to the third dimension." Science **294**(5547): 1708-12.
- Cukierman, E., R. Pankov, et al. (2002). "Cell interactions with three-dimensional matrices." Curr Opin Cell Biol **14**(5): 633-9.
- Cummings, R. D. and S. Kornfeld (1982). "Characterization of the structural determinants required for the high affinity interaction of asparagine-linked oligosaccharides with immobilized Phaseolus vulgaris leucoagglutinating and erythroagglutinating lectins." J Biol Chem **257**(19): 11230-4.
- Cummings, R. D., I. S. Trowbridge, et al. (1982). "A mouse lymphoma cell line resistant to the leucoagglutinating lectin from Phaseolus vulgaris is deficient in UDP-GlcNAc: alpha-D-mannoside beta 1,6 N-acetylglucosaminyltransferase." J Biol Chem **257**(22): 13421-7.
- Dagher, S. F., J. L. Wang, et al. (1995). "Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(4): 1213-7.

- Damke, H., T. Baba, et al. (1994). "Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation." J Cell Biol **127**(4): 915-34.
- David, L., J. M. Nesland, et al. (1994). "Expression of laminin, collagen IV, fibronectin, and type IV collagenase in gastric carcinoma. An immunohistochemical study of 87 patients." Cancer **73**(3): 518-27.
- De Mellow, J. S. and R. C. Baxter (1988). "Growth hormone-dependent insulin-like growth factor (IGF) binding protein both inhibits and potentiates IGF-I-stimulated DNA synthesis in human skin fibroblasts." Biochem Biophys Res Commun **156**(1): 199-204.
- Demetriou, M., M. Granovsky, et al. (2001). "Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation." Nature **409**(6821): 733-9.
- Demetriou, M., I. R. Nabi, et al. (1995). "Reduced contact-inhibition and substratum adhesion in epithelial cells expressing GlcNAc-transferase V." J Cell Biol **130**(2): 383-92.
- Dennis, J. W., M. Granovsky, et al. (1999). "Glycoprotein glycosylation and cancer progression." Biochim Biophys Acta **1473**(1): 21-34.
- Dennis, J. W., S. Laferte, et al. (1987). "Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis." Science **236**(4801): 582-5.

- Dennis, J. W., J. Pawling, et al. (2002). "UDP-N-acetylglucosamine:alpha-6-D-mannoside beta1,6 N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5) deficient mice." Biochim Biophys Acta **1573**(3): 414-22.
- Dennis, J. W., C. E. Warren, et al. (2001). "Genetic defects in N-glycosylation and cellular diversity in mammals." Curr Opin Struct Biol **11**(5): 601-7.
- Dike, L. E. and S. R. Farmer (1988). "Cell adhesion induces expression of growth-associated genes in suspension-arrested fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(18): 6792-6.
- Dilworth, S. M., C. E. Brewster, et al. (1994). "Transformation by polyoma virus middle T-antigen involves the binding and tyrosine phosphorylation of Shc." Nature **367**(6458): 87-90.
- Dimopoulos, M. A., B. Barlogie, et al. (1991). "High serum lactate dehydrogenase level as a marker for drug resistance and short survival in multiple myeloma." Ann Intern Med **115**(12): 931-5.
- Dolfi, F., M. Garcia-Guzman, et al. (1998). "The adaptor protein Crk connects multiple cellular stimuli to the JNK signaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15394-9.
- Dong, S. and R. C. Hughes (1997). "Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen)." Glycoconj J **14**(2): 267-74.

- Downward, J. (2004). "PI 3-kinase, Akt and cell survival." Semin Cell Dev Biol **15**(2): 177-82.
- Du, X., T. C. Saido, et al. (1995). "Calpain cleavage of the cytoplasmic domain of the integrin beta 3 subunit." J Biol Chem **270**(44): 26146-51.
- Dunn, W. A., T. P. Connolly, et al. (1986). "Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by rat hepatocytes: receptor pathway." J Cell Biol **102**(1): 24-36.
- Dunn, W. A., A. L. Hubbard, et al. (1980). "Low temperature selectively inhibits fusion between pinocytic vesicles and lysosomes during heterophagy of 125I-asialofetuin by the perfused rat liver." J Biol Chem **255**(12): 5971-8.
- Edwards, J. P., P. A. Hatton, et al. (1998). "Electrophysiology of the neuromuscular junction of the laminin-2 (merosin) deficient C57 BL/6J dy2J/dy2J dystrophic mouse." Brain Res **788**(1-2): 262-8.
- Elkin, M., N. Ilan, et al. (2001). "Heparanase as mediator of angiogenesis: mode of action." Faseb J **15**(9): 1661-3.
- Ellerhorst, J., P. Troncoso, et al. (1999). "Galectin-1 and galectin-3 expression in human prostate tissue and prostate cancer." Urol Res **27**(5): 362-7.

- Engel, M., P. Maurel, et al. (1996). "Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. I. cellular sites of synthesis of neurocan and phosphacan." J Comp Neurol **366**(1): 34-43.
- Esparza-Lopez, J., J. L. Montiel, et al. (2001). "Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A." J Biol Chem **276**(18): 14588-96.
- Evanko, S. P., J. C. Angello, et al. (1999). "Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(4): 1004-13.
- Faik, P., J. I. H. Walker, et al. (1988). "Mouse glucose-6-phosphate isomerase and neuroleukin have identical 3' sequences." Nature **332**: 455-7.
- Fang, S., M. Ferrone, et al. (2001). "The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(25): 14422-7.
- Felder, S., K. Miller, et al. (1990). "Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body." Cell **61**: 623-34.

- Fenczik, C. A., T. Sethi, et al. (1997). "Complementation of dominant suppression implicates CD98 in integrin activation." Nature **390**(6655): 81-5.
- Fernandes, B., U. Sagman, et al. (1991). "Beta 1-6 branched oligosaccharides as a marker of tumor progression in human breast and colon neoplasia." Cancer Res **51**(2): 718-23.
- Fielding, C. J. and P. E. Fielding (2001). "Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol." Adv Drug Deliv Rev **49**(3): 251-64.
- Filella, X., R. Molina, et al. (1991). "Serum phosphohexose isomerase activities in patients with colorectal cancer." Tumor Biology **12**: 360-7.
- Florkiewicz, R. Z., J. Anchin, et al. (1998). "The inhibition of fibroblast growth factor-2 export by cardenolides implies a novel function for the catalytic subunit of Na⁺,K⁺-ATPase." J Biol Chem **273**(1): 544-51.
- Florkiewicz, R. Z., R. A. Majack, et al. (1995). "Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway." J Cell Physiol **162**(3): 388-99.
- Fogerty, F. J., S. K. Akiyama, et al. (1990). "Inhibition of binding of fibronectin to matrix assembly sites by anti-integrin (alpha 5 beta 1) antibodies." J Cell Biol **111**(2): 699-708.

- Forsten, K. E., R. M. Akers, et al. (2001). "Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 regulation of IGF-I is altered in an acidic extracellular environment." J Cell Physiol **189**(3): 356-65.
- Friedlander, D. R., P. Milev, et al. (1994). "The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth." J Cell Biol **125**(3): 669-80.
- Frisch, S. M. (1994). "E1a induces the expression of epithelial characteristics." J Cell Biol **127**(4): 1085-96.
- Frisch, S. M. and H. Francis (1994). "Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis." J Cell Biol **124**(4): 619-26.
- Funasaka, T., A. Haga, et al. (2001). "Tumor autocrine motility factor is an angiogenic factor that stimulates endothelial cell motility." Biochem Biophys Res Commun **285**(1): 118-28.
- Funasaka, T., A. Haga, et al. (2002). "Autocrine motility factor secreted by tumor cells upregulates vascular endothelial growth factor receptor (Flt-1) expression in endothelial cells." Int J Cancer **101**(3): 217-23.

- Furtak, V., F. Hatcher, et al. (2001). "Galectin-3 mediates the endocytosis of beta-1 integrins by breast carcinoma cells." Biochem Biophys Res Commun **289**(4): 845-50.
- Furuta, Y., D. Ilic, et al. (1995). "Mesodermal defect in late phase of gastrulation by a targeted mutation of focal adhesion kinase, FAK." Oncogene **11**(10): 1989-95.
- Gatenby, R. A. and R. J. Gillies (2004). "Why do cancers have high aerobic glycolysis?" Nat Rev Cancer **4**(11): 891-9.
- Gaus, G., A. Y. Demir-Weusten, et al. (2002). "Extracellular pH modulates the secretion of fibronectin isoforms by human trophoblast." Acta Histochem **104**(1): 51-63.
- Geiger, B. and A. Bershadsky (2001). "Assembly and mechanosensory function of focal contacts." Curr Opin Cell Biol **13**(5): 584-92.
- Geiger, B., A. Bershadsky, et al. (2001). "Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(11): 793-805.
- Gengrinovitch, S., B. Berman, et al. (1999). "Glypican-1 is a VEGF165 binding proteoglycan that acts as an extracellular chaperone for VEGF165." J Biol Chem **274**(16): 10816-22.

- George, E. L., E. N. Georges-Labouesse, et al. (1993). "Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin." Development **119**(4): 1079-91.
- Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti (1990). "Elevated levels of the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells." Cell **60**(5): 849-59.
- Gitay-Goren, H., S. Soker, et al. (1992). "The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules." J Biol Chem **267**(9): 6093-8.
- Goerges, A. L. and M. A. Nugent (2003). "Regulation of vascular endothelial growth factor binding and activity by extracellular pH." J Biol Chem **278**(21): 19518-25.
- Goerges, A. L. and M. A. Nugent (2004). "pH regulates vascular endothelial growth factor binding to fibronectin: a mechanism for control of extracellular matrix storage and release." J Biol Chem **279**(3): 2307-15.
- Goldie, I. and A. Nachemson (1969). "Synovial pH in rheumatoid knee-joints. I. The effect of synovectomy." Acta Orthop Scand **40**(5): 634-41.
- Goldie, I. and A. Nachemson (1970). "Synovial pH in rheumatoid knee joints. II. The effect of local corticosteroid treatment." Acta Orthop Scand **41**(3): 354-62.

- Golovina, V. A. and M. P. Blaustein (1997). "Spatially and functionally distinct Ca^{2+} stores in sarcoplasmic and endoplasmic reticulum." Science **275**(5306): 1643-8.
- Gong, H. C., Y. Honjo, et al. (1999). "The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells." Cancer Res **59**(24): 6239-45.
- Graeber, T. G., C. Osmanian, et al. (1996). "Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours." Nature **379**(6560): 88-91.
- Granovsky, M., J. Fata, et al. (2000). "Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice." Nat Med **6**(3): 306-12.
- Grassadonia, A., N. Tinari, et al. (2004). "90K (Mac-2 BP) and galectins in tumor progression and metastasis." Glycoconj J **19**(7-9): 551-6.
- Gruenberg, J., G. Griffiths, et al. (1989). "Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro." J Cell Biol **108**(4): 1301-16.
- Gui, Y. and L. J. Murphy (2001). "Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) binds to fibronectin (FN): demonstration of IGF-I/IGFBP-3/fn ternary complexes in human plasma." J Clin Endocrinol Metab **86**(5): 2104-10.

- Guirguis, R., N. Javadpour, et al. (1990). "A new method for evaluation of urinary autocrine motility factor and tumor cell collagenase stimulating factor as markers for urinary tract cancers." J Occup Med **32**(9): 846-53.
- Gurney, M. E., B. R. Apatoff, et al. (1986). "Suppression of terminal axonal sprouting at the neuromuscular junction by monoclonal antibodies against a muscle-derived antigen of 56,000 daltons." Journal of Cell Biology **102**: 2264-2272.
- Gurney, M. E., B. R. Apatoff, et al. (1986). "Neuroleukin: A lymphokine product of lectin-stimulated T cells." Science **234**: 574-581.
- Guy, C. T., R. D. Cardiff, et al. (1992). "Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease." Mol Cell Biol **12**(3): 954-61.
- Hadari, Y. R., R. Arbel-Goren, et al. (2000). "Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis." J Cell Sci **113** (Pt 13): 2385-97.
- Haga, A., T. Funasaka, et al. (2003). "Autocrine motility factor signaling induces tumor apoptotic resistance by regulations Apaf-1 and Caspase-9 apoptosome expression." Int J Cancer **107**(5): 707-14.
- Haga, A., Y. Niinaka, et al. (2000). "Phosphohexose isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin/maturation factor is a multifunctional phosphoprotein." Biochim Biophys Acta **1480**(1-2): 235-44.

- Haglund, K., P. P. Di Fiore, et al. (2003). "Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis." Trends Biochem Sci **28**(11): 598-603.
- Han, D. C. and J. L. Guan (1999). "Association of focal adhesion kinase with Grb7 and its role in cell migration." J Biol Chem **274**(34): 24425-30.
- Hanahan, D. and J. Folkman (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell **86**(3): 353-64.
- Harigaya, T., H. Ogawa, et al. (1996). "The mRNA expression of neurocan, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, in neoplastic mammary glands in mice." Zoolog Sci **13**(5): 665-8.
- Hegele, A., A. Heidenreich, et al. (2003). "Cellular fibronectin in patients with transitional cell carcinoma of the bladder." Urol Res **30**(6): 363-6.
- Helenius, A. and M. Aebi (2001). "Intracellular functions of N-linked glycans." Science **291**(5512): 2364-9.
- Henley, J. R., E. W. Krueger, et al. (1998). "Dynamin-mediated internalization of caveolae." J Cell Biol **141**(1): 85-99.
- Henrick, K., S. Bawumia, et al. (1998). "Evidence for subsites in the galectins involved in sugar binding at the nonreducing end of the central galactose of

oligosaccharide ligands: sequence analysis, homology modeling and mutagenesis studies of hamster galectin-3." Glycobiology **8**(1): 45-57.

Herrmann, J., C. W. Turck, et al. (1993). "Primary structure of the soluble lactose binding lectin L-29 from rat and dog and interaction of its non-collagenous proline-, glycine-, tyrosine-rich sequence with bacterial and tissue collagenase." J Biol Chem **268**(35): 26704-11.

Hersel, U., C. Dahmen, et al. (2003). "RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond." Biomaterials **24**(24): 4385-415.

Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-79.

Higuchi, M., N. Masuyama, et al. (2001). "Akt mediates Rac/Cdc42-regulated cell motility in growth factor-stimulated cells and in invasive PTEN knockout cells." Curr Biol **11**(24): 1958-62.

Hirabayashi, J., T. Hashidate, et al. (2002). "Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography." Biochim Biophys Acta **1572**(2-3): 232-54.

Hirashima, M., Y. Kashio, et al. (2004). "Galectin-9 in physiological and pathological conditions." Glycoconj J **19**(7-9): 593-600.

- Hirono, Y., S. Fushida, et al. (1996). "Expression of autocrine motility factor receptor correlates with disease progression in human gastric cancer." British Journal of Cancer **74**: 2003-2007.
- Holler, D. and I. Dikic (2004). "Receptor endocytosis via ubiquitin-dependent and -independent pathways." Biochem Pharmacol **67**(6): 1013-7.
- Holly, S. P., M. K. Larson, et al. (2000). "Multiple roles of integrins in cell motility." Exp Cell Res **261**(1): 69-74.
- Homandberg, G. A., J. E. Williams, et al. (1985). "Heparin-binding fragments of fibronectin are potent inhibitors of endothelial cell growth." Am J Pathol **120**(3): 327-32.
- Honjo, Y., P. Nangia-Makker, et al. (2001). "Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells." Clin Cancer Res **7**(3): 661-8.
- Hopkins, C. R. and I. S. Trowbridge (1983). "Internalization and processing of transferrin and the transferrin receptor in human carcinoma A431 cells." J Cell Biol **97**(2): 508-21.
- Horowitz, A. and M. Simons (1998). "Phosphorylation of the cytoplasmic tail of syndecan-4 regulates activation of protein kinase Calpha." J Biol Chem **273**(40): 25548-51.

Hsu, D. K. and F. T. Liu (2004). "Regulation of cellular homeostasis by galectins." Glycoconj J **19**(7-9): 507-15.

Hsu, D. K., R. Y. Yang, et al. (2000). "Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses." Am J Pathol **156**(3): 1073-83.

Hubbard, S. C., D. M. Kranz, et al. (1986). "Glycosylation of the T-cell antigen-specific receptor and its potential role in lectin-mediated cytotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(6): 1852-6.

Huflejt, M. E., C. W. Turck, et al. (1993). "L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 in vivo and by casein kinase I." J Biol Chem **268**(35): 26712-8.

Hughes, R. C. (1999). "Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins." Biochim Biophys Acta **1473**(1): 172-85.

Hughes, R. C. (2001). "Galectins as modulators of cell adhesion." Biochimie **83**(7): 667-76.

Hughes, R. C. (2004). "Galectins in kidney development." Glycoconj J **19**(7-9): 621-9.

Humphries, M. J., M. A. Travis, et al. (2004). "Mechanisms of integration of cells and extracellular matrices by integrins." Biochem Soc Trans **32**(Pt 5): 822-5.

Hynes, R. O. (1990). Fibronectins.

Hynes, R. O. (1992). "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." Cell **69**(1): 11-25.

Hynes, R. O. (1999). "The dynamic dialogue between cells and matrices: implications of fibronectin's elasticity." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 2588-90.

Iacobelli, S., E. Arno, et al. (1986). "Detection of antigens recognized by a novel monoclonal antibody in tissue and serum from patients with breast cancer." Cancer Res **46**(6): 3005-10.

Iacobelli, S., P. Sismondi, et al. (1994). "Prognostic value of a novel circulating serum 90K antigen in breast cancer." Br J Cancer **69**(1): 172-6.

Ilic, D., B. Kovacic, et al. (2004). "FAK promotes organization of fibronectin matrix and fibrillar adhesions." J Cell Sci **117**(Pt 2): 177-87.

Ioachim, E., A. Charchanti, et al. (2002). "Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and

laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression." Eur J Cancer **38**(18): 2362-70.

Ioffe, E. and P. Stanley (1994). "Mice lacking N-acetylglucosaminyltransferase I activity die at mid-gestation, revealing an essential role for complex or hybrid N-linked carbohydrates." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 728-32.

Iozzo, R. V., I. R. Cohen, et al. (1994). "The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices." Biochem J **302** (Pt 3): 625-39.

Jeffery, C. J. (1999). "Moonlighting proteins." Trends Biochem Sci **24**(1): 8-11.

Joazeiro, C. A. and A. M. Weissman (2000). "RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity." Cell **102**(5): 549-52.

Jones, J. I. and D. R. Clemmons (1995). "Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions." Endocr Rev **16**(1): 3-34.

Juriscic, V., G. Konjevic, et al. (2004). "The comparison of spontaneous LDH release activity from cultured PBMC with sera LDH activity in non-Hodgkin's lymphoma patients." Med Oncol **21**(2): 179-85.

Kadler, K. (2004). "Matrix loading: assembly of extracellular matrix collagen fibrils during embryogenesis." Birth Defects Res Part C Embryo Today **72**(1): 1-11.

- Kaiura, T. L., H. Itoh, et al. (1999). "The role of mitogen-activated protein kinase and protein kinase C in fibronectin production in human vascular smooth muscle cells." J Surg Res **84**(2): 212-7.
- Katz, B. Z., E. Zamir, et al. (2000). "Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions." Mol Biol Cell **11**(3): 1047-60.
- Keely, P. J., J. K. Westwick, et al. (1997). "Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K." Nature **390**(6660): 632-6.
- Kiani, C., L. Chen, et al. (2002). "Structure and function of aggrecan." Cell Res **12**(1): 19-32.
- Kim, M., C. V. Carman, et al. (2003). "Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins." Science **301**(5640): 1720-5.
- Kimura, K., M. Ito, et al. (1996). "Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)." Science **273**(5272): 245-8.
- King, W. G., M. D. Mattaliano, et al. (1997). "Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation." Mol Cell Biol **17**(8): 4406-18.

- Kiyokawa, E., Y. Hashimoto, et al. (1998). "Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180." Genes Dev **12**(21): 3331-6.
- Kiyokawa, E., Y. Hashimoto, et al. (1998). "Evidence that DOCK180 up-regulates signals from the CrkII-p130(Cas) complex." J Biol Chem **273**(38): 24479-84.
- Klass, C. M., J. R. Couchman, et al. (2000). "Control of extracellular matrix assembly by syndecan-2 proteoglycan." J Cell Sci **113** (Pt 3): 493-506.
- Klein, G., E. Vellenga, et al. (2004). "The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia." Crit Rev Oncol Hematol **50**(2): 87-100.
- Kleinman, H. K., J. Koblinski, et al. (2001). "Role of basement membrane in tumor growth and metastasis." Surg Oncol Clin N Am **10**(2): 329-38, ix.
- Klemke, R. L., J. Leng, et al. (1998). "CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration." J Cell Biol **140**(4): 961-72.
- Knudson, C. B. and W. Knudson (2001). "Cartilage proteoglycans." Semin Cell Dev Biol **12**(2): 69-78.
- Kohn, E. C., L. A. Liotta, et al. (1990). "Autocrine motility factor stimulates a three-fold increase in inositol phosphate in human melanoma cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **166**: 757-64.

- Koops, A., J. Kappler, et al. (1996). "Cultured astrocytes express biglycan, a chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan supporting the survival of neocortical neurons." Brain Res Mol Brain Res **41**(1-2): 65-73.
- Kornfeld, R. and S. Kornfeld (1985). "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." Annu Rev Biochem **54**: 631-64.
- Kosmehl, H., A. Berndt, et al. (1996). "Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects." Virchows Arch **429**(6): 311-22.
- Koukourakis, M. I., A. Giatromanolaki, et al. (2003). "Lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 5: differential expression by neoplastic and stromal cells in non-small cell lung cancer and other epithelial malignant tumors." Tumour Biol **24**(4): 199-202.
- Kramer, K. L. and H. J. Yost (2003). "Heparan sulfate core proteins in cell-cell signaling." Annu Rev Genet **37**: 461-84.
- Krugmann, S., R. Williams, et al. (2004). "ARAP3 is a PI3K- and rap-regulated GAP for RhoA." Curr Biol **14**(15): 1380-4.
- Kugler, W., K. Breme, et al. (1998). "Molecular basis of neurological dysfunction coupled with haemolytic anaemia in human glucose-6-phosphate isomerase (GPI) deficiency." Hum Genet **103**(4): 450-4.

Kuznetsova, N., S. L. Chi, et al. (1998). "Sugars and polyols inhibit fibrillogenesis of type I collagen by disrupting hydrogen-bonded water bridges between the helices." Biochemistry **37**(34): 11888-95.

LaFlamme, S. E., L. A. Thomas, et al. (1994). "Single subunit chimeric integrins as mimics and inhibitors of endogenous integrin functions in receptor localization, cell spreading and migration, and matrix assembly." J Cell Biol **126**(5): 1287-98.

Lanzara, V. and E. Grazi (1987). "On an Mg²⁺-dependent interaction of actin with glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase. The fundamental role of KCl in the organization of F-actin." FEBS Lett **221**(2): 387-90.

Lauffenburger, D. A. and A. F. Horwitz (1996). "Cell migration: a physically integrated molecular process." Cell **84**(3): 359-69.

Le Marer, N. and R. C. Hughes (1996). "Effects of the carbohydrate-binding protein galectin-3 on the invasiveness of human breast carcinoma cells." J Cell Physiol **168**(1): 51-8.

Le, P. U., N. Benlimame, et al. (2000). "Clathrin-mediated endocytosis and recycling of autocrine motility factor receptor to fibronectin fibrils is a limiting factor for NIH-3T3 cell motility." J Cell Sci **113** (Pt 18): 3227-40.

- Le, P. U., G. Guay, et al. (2002). "Caveolin-1 Is a Negative Regulator of Caveolae-mediated Endocytosis to the Endoplasmic Reticulum." J Biol Chem **277**(5): 3371-9.
- Le, P. U. and I. R. Nabi (2003). "Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum." J Cell Sci **116**(Pt 6): 1059-71.
- Leclerc, N., A. Vallée, et al. (2000). "Expression of the AMF/neuroleukin receptor in developing and adult rat cerebellum." Journal of Neuroscience Research **60**: 602-12.
- Lee, B. H., R. W. Park, et al. (1996). "Stimulation of fibronectin synthesis through the protein kinase C signalling pathway in normal and transformed human lung fibroblasts." Biochem Mol Biol Int **39**(5): 895-904.
- Leevers, S. J., B. Vanhaesebroeck, et al. (1999). "Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage." Curr Opin Cell Biol **11**(2): 219-25.
- Leffler, H., S. Carlsson, et al. (2004). "Introduction to galectins." Glycoconj J **19**(7-9): 433-40.
- Levy, Y., R. Arbel-Goren, et al. (2001). "Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion." J Biol Chem **276**(33): 31285-95.

Li, W. P. and J. Roth (1997). "Expression of beta 1,6 branched asparagine-linked oligosaccharides in non-mitotic and non-migratory cells of normal human and rat tissues." Int J Cancer **71**(3): 483-90.

Liang, J.-s., T. Kim, et al. (2003). "Overexpression of the Tumor Autocrine Motility Factor Receptor Gp78, a Ubiquitin Protein Ligase, Results in Increased Ubiquitinylation and Decreased Secretion of Apolipoprotein B100 in HepG2 Cells." J. Biol. Chem. **278**(26): 23984-8.

Liaw, L. and H. C. Crawford (1999). "Functions of the extracellular matrix and matrix degrading proteases during tumor progression." Braz J Med Biol Res **32**(7): 805-12.

Lin, X., G. Wei, et al. (2000). "Disruption of gastrulation and heparan sulfate biosynthesis in EXT1-deficient mice." Dev Biol **224**(2): 299-311.

Lindstedt, R., G. Apodaca, et al. (1993). "Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway." J Biol Chem **268**(16): 11750-7.

Liotta, L. A., R. Mandler, et al. (1986). "Tumor cell autocrine motility factor." Proceedings of the National Academy of Science **83**: 3302-6.

- Liu, A. X., J. R. Testa, et al. (1998). "AKT2, a member of the protein kinase B family, is activated by growth factors, v-Ha-ras, and v-src through phosphatidylinositol 3-kinase in human ovarian epithelial cancer cells." Cancer Res **58**(14): 2973-7.
- Lobsanov, Y. D., M. A. Gitt, et al. (1993). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the human dimeric S-Lac lectin (L-14-II)." J Mol Biol **233**(3): 553-5.
- Lobsanov, Y. D., M. A. Gitt, et al. (1993). "X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-A resolution." J Biol Chem **268**(36): 27034-8.
- Lu, C., J. Takagi, et al. (2001). "Association of the membrane proximal regions of the alpha and beta subunit cytoplasmic domains constrains an integrin in the inactive state." J Biol Chem **276**(18): 14642-8.
- Lu, Y., J. C. Pelling, et al. (1994). "Tumor cell surface beta 1-6 branched oligosaccharides and lung metastasis." Clin Exp Metastasis **12**(1): 47-54.
- Luo, Y., J. M. Long, et al. (2002). "A link between maze learning and hippocampal expression of neuroleukin and its receptor gp78." J Neurochem **80**(2): 354-61.
- MacDougall, J. R. and L. M. Matrisian (1995). "Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis." Cancer Metastasis Rev **14**(4): 351-62.

- Maeda, N. and M. Noda (1996). "6B4 proteoglycan/phosphacan is a repulsive substratum but promotes morphological differentiation of cortical neurons." Development **122**(2): 647-58.
- Magnusson, M. K. and D. F. Mosher (1998). "Fibronectin : Structure, Assembly, and Cardiovascular Implications." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(9): 1363-70.
- Mali, M., P. Jaakkola, et al. (1990). "Sequence of human syndecan indicates a novel gene family of integral membrane proteoglycans." J Biol Chem **265**(12): 6884-9.
- Marquez-Curtis, L. A., A. Dobrowsky, et al. (2001). "Matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinase secretion by haematopoietic and stromal precursors and their production in normal and leukaemic long-term marrow cultures." Br J Haematol **115**(3): 595-604.
- Martenson, C., K. Stone, et al. (1993). "Fast axonal transport is required for growth cone advance." Nature **366**(6450): 66-9.
- Masters, C. (1984). "Interactions between glycolytic enzymes and components of the cytomatrix." Journal of Cell Biology **99**(1 Pt 2): 222s-5s.
- Matarrese, P., O. Fusco, et al. (2000). "Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties." Int J Cancer **85**(4): 545-54.

Mathupala, S. P., A. Rempel, et al. (1997). "Aberrant glycolytic metabolism of cancer cells: a remarkable coordination of genetic, transcriptional, post-translational, and mutational events that lead to a critical role for type II hexokinase." J Bioenerg Biomembr **29**(4): 339-43.

Matrisian, L. M. (1992). "The matrix-degrading metalloproteinases." Bioessays **14**(7): 455-63.

Matsumoto, I., M. Maccioni, et al. (2002). "How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint- specific autoimmune disease." Nat Immunol **3**(4): 360-5.

Matsumoto, I., A. Staub, et al. (1999). "Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme." Science **286**(5445): 1732-5.

Maurel, P., U. Rauch, et al. (1994). "Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(7): 2512-6.

Mautner, V. and R. O. Hynes (1977). "Surface distribution of LETS protein in relation to the cytoskeleton of normal and transformed cells." J Cell Biol **75**(3): 743-68.

McKeown-Longo, P. J. and D. F. Mosher (1983). "Binding of plasma fibronectin to cell layers of human skin fibroblasts." J Cell Biol **97**(2): 466-72.

- McNeil, P. L., L. Muthukrishnan, et al. (1989). "Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells." J Cell Biol **109**(2): 811-22.
- Mehul, B. and R. C. Hughes (1997). "Plasma membrane targetting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion." J Cell Sci **110 (Pt 10)**: 1169-78.
- Mejean, C., F. Pons, et al. (1989). "Antigenic probes locate binding sites for the glycolytic enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, aldolase and phosphofructokinase on the actin monomer in microfilaments." Biochem J **264**(3): 671-7.
- Melching, L. I. and P. J. Roughley (1989). "The synthesis of dermatan sulphate proteoglycans by fetal and adult human articular cartilage." Biochem J **261**(2): 501-8.
- Mellman, I. (1996). "Endocytosis and molecular sorting." Annual Review of Cell and Developmental Biology **12**: 575-626.
- Mellman, I. and G. Warren (2000). "The road taken: past and future foundations of membrane traffic." Cell **100**(1): 99-112.
- Menon, R. P. and R. C. Hughes (1999). "Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex." Eur J Biochem **264**(2): 569-76.

- Mercurius, K. O. and A. O. Morla (2001). "Cell adhesion and signaling on the fibronectin 1st type III repeat; requisite roles for cell surface proteoglycans and integrins." BMC Cell Biol **2**(1): 18.
- Meredith, J. E., Jr., B. Fazeli, et al. (1993). "The extracellular matrix as a cell survival factor." Mol Biol Cell **4**(9): 953-61.
- Merlini, G., V. Perfetti, et al. (1993). "Acute phase proteins and prognosis in multiple myeloma." Br J Haematol **83**(4): 595-601.
- Metzler, M., A. Gertz, et al. (1994). "Complex asparagine-linked oligosaccharides are required for morphogenic events during post-implantation development." Embo J **13**(9): 2056-65.
- Miaczynska, M., S. Christoforidis, et al. (2004). "APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment." Cell **116**(3): 445-56.
- Mignatti, P., T. Morimoto, et al. (1992). "Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex." J Cell Physiol **151**(1): 81-93.
- Miki, H., S. Suetsugu, et al. (1998). "WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac." Embo J **17**(23): 6932-41.

- Milev, P., D. R. Friedlander, et al. (1994). "Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules." J Cell Biol **127**(6 Pt 1): 1703-15.
- Miranti, C. K. and J. S. Brugge (2002). "Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction." Nat Cell Biol **4**(4): E83-90.
- Mishra, S., A. Raz, et al. (2004). "Insulin-like growth factor binding protein-3 interacts with autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase (AMF/PGI) and inhibits the AMF/PGI function." Cancer Res **64**(7): 2516-22.
- Mizrachi, Y. (1989). "Neurotrophic activity of monomeric glucophosphoisomerase was blocked by human immunodeficiency virus (HIV-1) and peptides from HIV-1 envelope glycoprotein." J Neurosci Res **23**(2): 217-24.
- Moiseeva, E. P., Q. Javed, et al. (2000). "Galectin 1 is involved in vascular smooth muscle cell proliferation." Cardiovasc Res **45**(2): 493-502.
- Morales-Ruiz, M., D. Fulton, et al. (2000). "Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt." Circ Res **86**(8): 892-6.

- Morio, H., Y. Honda, et al. (2003). "EXT gene family member rib-2 is essential for embryonic development and heparan sulfate biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*." Biochem Biophys Res Commun **301**(2): 317-23.
- Morris, R., H. Cox, et al. (2004). "Rafts, little caves and large potholes: how lipid structure interacts with membrane proteins to create functionally diverse membrane environments." Subcell Biochem **37**: 35-118.
- Mosher, D. F. (1995). "Organization of the provisional fibronectin matrix: control by products of blood coagulation." Thromb Haemost **74**(1): 529-33.
- Mould, A. P. and M. J. Humphries (2004). "Regulation of integrin function through conformational complexity: not simply a knee-jerk reaction?" Curr Opin Cell Biol **16**(5): 544-51.
- Mould, A. P., E. J. Symonds, et al. (2003). "Structure of an integrin-ligand complex deduced from solution x-ray scattering and site-directed mutagenesis." J Biol Chem **278**(41): 39993-9.
- Mow, V. C., W. Zhu, et al. (1989). "The influence of link protein stabilization on the viscometric properties of proteoglycan aggregate solutions." Biochim Biophys Acta **992**(2): 201-8.
- Nabi, I. R. (1999). "The polarization of the motile cell." Journal of Cell Science **112**: 1803-1811.

Nabi, I. R. and P. U. Le (2003). "Caveolae/raft-dependent endocytosis." J Cell Biol **161**(4): 673-7.

Nabi, I. R., H. Watanabe, et al. (1990). "Identification of B16-F1 melanoma autocrine motility-like factor receptor." Cancer Research **50**: 409-414.

Nagai, T., N. Yamakawa, et al. (1991). "Monoclonal antibody characterization of two distant sites required for function of the central cell-binding domain of fibronectin in cell adhesion, cell migration, and matrix assembly." J Cell Biol **114**(6): 1295-305.

Nagy, I. and R. M. Macleod (1979). "Some biochemical characteristics of hormone-secreting pituitary tumors and of the host's anterior pituitary gland." Mol Cell Endocrinol **13**(3): 317-32.

Nakagawa, H., M. Zheng, et al. (1996). "Detailed oligosaccharide structures of human integrin alpha 5 beta 1 analyzed by a three-dimensional mapping technique." Eur J Biochem **237**(1): 76-85.

Nakamori, S., H. Watanabe, et al. (1994). "Expression of autocrine motility factor receptor in colorectal cancer as a predictor for disease recurrence." Cancer **74**: 1855-1862.

Nangia-Makker, P., S. Baccarini, et al. (2000). "Carbohydrate-recognition and angiogenesis." Cancer Metastasis Rev **19**(1-2): 51-7.

- Nangia-Makker, P., Y. Honjo, et al. (2000). "Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis." Am J Pathol **156**(3): 899-909.
- Nelson, A. R., B. Fingleton, et al. (2000). "Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications." J Clin Oncol **18**(5): 1135-49.
- Nickel, W. (2003). "The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes." Eur J Biochem **270**(10): 2109-19.
- Niinaka, Y., A. Haga, et al. (2002). "Regulation of cell motility via high and low affinity autocrine motility factor (AMF) receptor in human oral squamous carcinoma cells." Oral Oncol **38**(1): 49-55.
- Niinaka, Y., S. Paku, et al. (1998). "Expression and secretion of neuroleukin/phosphohexose isomerase/maturation factor as autocrine motility factor by tumor cells." Cancer Research **58**: 2667-2674.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1995). "Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filipodia." Cell **81**: 53-62.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1999). "Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement." J Cell Biol **144**(6): 1235-44.

- Nugent, M. A. and R. V. Iozzo (2000). "Fibroblast growth factor-2." Int J Biochem Cell Biol **32**(2): 115-20.
- Ochieng, J., R. Fridman, et al. (1994). "Galectin-3 is a novel substrate for human matrix metalloproteinases-2 and -9." Biochemistry **33**(47): 14109-14.
- Ochieng, J., V. Furtak, et al. (2004). "Extracellular functions of galectin-3." Glycoconj J **19**(7-9): 527-35.
- Ochieng, J., M. L. Leite-Browning, et al. (1998). "Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3." Biochem Biophys Res Commun **246**(3): 788-91.
- Ohashi, T., D. P. Kiehart, et al. (1999). "Dynamics and elasticity of the fibronectin matrix in living cell culture visualized by fibronectin-green fluorescent protein." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2153-8.
- Ohashi, T., D. P. Kiehart, et al. (2002). "Dual labeling of the fibronectin matrix and actin cytoskeleton with green fluorescent protein variants." J Cell Sci **115**(Pt 6): 1221-9.
- Otto, T., W. Birchmeier, et al. (1994). "Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expression as a prognostic factor in patients with bladder carcinomas." Cancer Research **54**: 3120-3123.

- Ozeki, Y., T. Matsui, et al. (1995). "Tissue fibronectin is an endogenous ligand for galectin-1." Glycobiology **5**(2): 255-61.
- Pace, K. E. and L. G. Baum (2004). "Insect galectins: roles in immunity and development." Glycoconj J **19**(7-9): 607-14.
- Pankov, R., E. Cukierman, et al. (2000). "Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of alpha(5)beta(1) integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis." J Cell Biol **148**(5): 1075-90.
- Pankov, R. and K. M. Yamada (2002). "Fibronectin at a glance." J Cell Sci **115**(Pt 20): 3861-3.
- Partridge, E. A., C. Le Roy, et al. (2004). "Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis." Science **306**(5693): 120-4.
- Patel, P. S., G. N. Rawal, et al. (1995). "Comparison between serum levels of carcinoembryonic antigen, sialic acid, and phosphohexose isomeras in lung cancer." Neoplasia **42**: 271-4.
- Patterson, R. J., W. Wang, et al. (2004). "Understanding the biochemical activities of galectin-1 and galectin-3 in the nucleus." Glycoconj J **19**(7-9): 499-506.
- Perillo, N. L., M. E. Marcus, et al. (1998). "Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death." J Mol Med **76**(6): 402-12.

- Perissinotto, D., P. Iacopetti, et al. (2000). "Avian neural crest cell migration is diversely regulated by the two major hyaluronan-binding proteoglycans PG-M/versican and aggrecan." Development **127**(13): 2823-42.
- Perkins, S. J., A. S. Nealis, et al. (1989). "Immunoglobulin fold and tandem repeat structures in proteoglycan N-terminal domains and link protein." J Mol Biol **206**(4): 737-53.
- Pierce, M. and J. Arango (1986). "Rous sarcoma virus-transformed baby hamster kidney cells express higher levels of asparagine-linked tri- and tetraantennary glycopeptides containing [GlcNAc-beta (1,6)Man-alpha (1,6)Man] and poly-N-acetyllactosamine sequences than baby hamster kidney cells." J Biol Chem **261**(23): 10772-7.
- Plaas, A. H., P. J. Neame, et al. (1990). "Identification of the keratan sulfate attachment sites on bovine fibromodulin." J Biol Chem **265**(33): 20634-40.
- Plemper, R. K. and D. H. Wolf (1999). "Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease." Trends Biochem Sci **24**(7): 266-70.
- Plow, E. F., T. A. Haas, et al. (2000). "Ligand binding to integrins." J Biol Chem **275**(29): 21785-8.
- Poirier, F. (2002). "Roles of galectins in vivo." Biochem Soc Symp(69): 95-103.

- Pollard, T. D., L. Blanchoin, et al. (2000). "Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells." Annu Rev Biophys Biomol Struct **29**: 545-76.
- Price, J. T., M. T. Bonovich, et al. (1997). "The biochemistry of cancer dissemination." Crit Rev Biochem Mol Biol **32**(3): 175-253.
- Probstmeier, R., D. Montag, et al. (1995). "Galectin-3, a beta-galactoside-binding animal lectin, binds to neural recognition molecules." J Neurochem **64**(6): 2465-72.
- Qian, Y., X. Zhong, et al. (2005). "ILK mediates actin filament rearrangements and cell migration and invasion through PI3K/Akt/Rac1 signaling." Oncogene.
- Rabinovich, G. A., M. A. Toscano, et al. (2004). "Shedding light on the immunomodulatory properties of galectins: novel regulators of innate and adaptive immune responses." Glycoconj J **19**(7-9): 565-73.
- Rauch, U., L. Karthikeyan, et al. (1992). "Cloning and primary structure of neurocan, a developmentally regulated, aggregating chondroitin sulfate proteoglycan of brain." J Biol Chem **267**(27): 19536-47.
- Raz, A., L. Meromsky, et al. (1987). "Transformation-related changes in the expression of endogenous cell lectins." Int J Cancer **39**(3): 353-60.

- Registre, M., J. G. Goetz, et al. (2004). "The gene product of the gp78/AMFR ubiquitin E3 ligase cDNA is selectively recognized by the 3F3A antibody within a subdomain of the endoplasmic reticulum." Biochem Biophys Res Commun **320**(4): 1316-22.
- Reich, Z., J. J. Boniface, et al. (1997). "Ligand-specific oligomerization of T-cell receptor molecules." Nature **387**(6633): 617-20.
- Reiske, H. R., S. C. Kao, et al. (1999). "Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration." J Biol Chem **274**(18): 12361-6.
- Richardson, A., R. K. Malik, et al. (1997). "Inhibition of cell spreading by expression of the C-terminal domain of focal adhesion kinase (FAK) is rescued by coexpression of Src or catalytically inactive FAK: a role for paxillin tyrosine phosphorylation." Mol Cell Biol **17**(12): 6906-14.
- Ridley, A. J. (2001). "Rho GTPases and cell migration." J Cell Sci **114**(Pt 15): 2713-22.
- Ridley, A. J., H. F. Paterson, et al. (1992). "The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling." Cell **70**: 401-410.

- Riveline, D., E. Zamir, et al. (2001). "Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism." J Cell Biol **153**(6): 1175-86.
- Roberts, R., J. Gallagher, et al. (1988). "Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis." Nature **332**(6162): 376-8.
- Rocco, M., M. Carson, et al. (1983). "Dependence of the shape of the plasma fibronectin molecule on solvent composition. Ionic strength and glycerol content." J Biol Chem **258**(23): 14545-9.
- Rodal, S. K., G. Skretting, et al. (1999). "Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles." Mol Biol Cell **10**(4): 961-74.
- Rogalski-Wilk, A. A. and R. S. Cohen (1997). "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity and F-actin associations in synaptosomes and postsynaptic densities of porcine cerebral cortex." Cellular and Molecular Neurobiology **17**: 51-70.
- Roth, J. (2002). "Protein N-glycosylation along the secretory pathway: relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions." Chem Rev **102**(2): 285-303.

- Rottner, K., A. Hall, et al. (1999). "Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics." Curr Biol **9**(12): 640-8.
- Rouselle, P. (2002). "Laminine 5, migration cellulaire et cancer." medecine/science **18**: 989-94.
- Rudolph, M. G., P. Bayer, et al. (1998). "The Cdc42/Rac interactive binding region motif of the Wiskott Aldrich syndrome protein (WASP) is necessary but not sufficient for tight binding to Cdc42 and structure formation." J Biol Chem **273**(29): 18067-76.
- Ruoslahti, E. and M. D. Pierschbacher (1987). "New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins." Science **238**(4826): 491-7.
- Ruoslahti, E. and J. C. Reed (1994). "Anchorage dependence, integrins, and apoptosis." Cell **77**(4): 477-8.
- Ruoslahti, E., Y. Yamaguchi, et al. (1992). "Extracellular matrix/growth factor interactions." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **57**: 309-15.
- Saci, A. and C. L. Carpenter (2005). "RhoA GTPase regulates B cell receptor signaling." Mol Cell **17**(2): 205-14.
- Sanford, G. L. and S. Harris-Hooker (1990). "Stimulation of vascular cell proliferation by beta-galactoside specific lectins." Faseb J **4**(11): 2912-8.

- Sano, H., D. K. Hsu, et al. (2003). "Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages." J Clin Invest **112**(3): 389-97.
- Saoncella, S., F. Echtermeyer, et al. (1999). "Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 2805-10.
- Sasisekharan, R., S. Ernst, et al. (1997). "On the regulation of fibroblast growth factor activity by heparin-like glycosaminoglycans." Angiogenesis **1**(1): 45-54.
- Sato, H. and M. Seiki (1996). "Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in tumor metastasis." J Biochem (Tokyo) **119**(2): 209-15.
- Sato, S., I. Burdett, et al. (1993). "Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex." Exp Cell Res **207**(1): 8-18.
- Sato, S. and J. Nieminen (2004). "Seeing strangers or announcing "danger": galectin-3 in two models of innate immunity." Glycoconj J **19**(7-9): 583-91.
- Schachter, H. (1986). "Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides." Biochem Cell Biol **64**(3): 163-81.

- Schaller, M., D. R. Burton, et al. (2001). "Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease." Nat Immunol **2**(8): 746-53.
- Schaller, M. D., C. A. Borgman, et al. (1992). "pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(11): 5192-6.
- Schaller, M. D., J. D. Hildebrand, et al. (1994). "Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src." Mol Cell Biol **14**(3): 1680-8.
- Schaller, M. D. and J. T. Parsons (1994). "Focal adhesion kinase and associated proteins." Curr Opin Cell Biol **6**(5): 705-10.
- Schlaepfer, D. D., S. K. Hanks, et al. (1994). "Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase." Nature **372**(6508): 786-91.
- Schlaepfer, D. D., C. R. Hauck, et al. (1999). "Signaling through focal adhesion kinase." Prog Biophys Mol Biol **71**(3-4): 435-78.
- Schlaepfer, D. D. and T. Hunter (1996). "Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases." Mol Cell Biol **16**(10): 5623-33.

- Schlaepfer, D. D. and T. Hunter (1998). "Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs?" Trends Cell Biol **8**(4): 151-7.
- Schoenwaelder, S. M. and K. Burridge (1999). "Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins." Curr Opin Cell Biol **11**(2): 274-86.
- Schoenwaelder, S. M., Y. Yuan, et al. (2000). "Calpain regulation of integrin alpha IIb beta 3 signaling in human platelets." Platelets **11**(4): 189-98.
- Schönherr, E., H. T. Jarvelainen, et al. (1991). "Effects of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 on the synthesis of a large versican-like chondroitin sulfate proteoglycan by arterial smooth muscle cells." J Biol Chem **266**(26): 17640-7.
- Schönherr, E., M. G. Kinsella, et al. (1997). "Genistein selectively inhibits platelet-derived growth factor-stimulated versican biosynthesis in monkey arterial smooth muscle cells." Arch Biochem Biophys **339**(2): 353-61.
- Schulz, L. C. and J. M. Bahr (2003). "Glucose-6-phosphate isomerase is necessary for embryo implantation in the domestic ferret." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8561-6.
- Schulz, L. C. and J. M. Bahr (2004). "Potential endocrine function of the glycolytic enzyme glucose-6-phosphate isomerase during implantation." Gen Comp Endocrinol **137**(3): 283-7.

- Schwartz, M. A. and M. H. Ginsberg (2002). "Networks and crosstalk: integrin signalling spreads." Nat Cell Biol **4**(4): E65-8.
- Schwartz, M. A., M. D. Schaller, et al. (1995). "Integrins: emerging paradigms of signal transduction." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 549-99.
- Schwartz, M. K. (1973). "Enzymes in cancer." Clinical Chemistry **19**: 10-22.
- Seberger, P. J. and W. G. Chaney (1999). "Control of metastasis by Asn-linked, beta1-6 branched oligosaccharides in mouse mammary cancer cells." Glycobiology **9**(3): 235-41.
- Sechler, J. L., A. M. Cumiskey, et al. (2000). "A novel RGD-independent fibronectin assembly pathway initiated by alpha4beta1 integrin binding to the alternatively spliced V region." J Cell Sci **113** (Pt 8): 1491-8.
- Seelentag, W. K., W. P. Li, et al. (1998). "Prognostic value of beta1,6-branched oligosaccharides in human colorectal carcinoma." Cancer Res **58**(23): 5559-64.
- Seetharaman, J., A. Kanigsberg, et al. (1998). "X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-A resolution." J Biol Chem **273**(21): 13047-52.

- Shaw, L. M., I. Rabinovitz, et al. (1997). "Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the $\alpha 6 \beta 4$ integrin promotes carcinoma invasion." Cell **91**(7): 949-60.
- Shen, Y., G. Schneider, et al. (1998). "Direct association of protein-tyrosine phosphatase PTP-PEST with paxillin." J Biol Chem **273**(11): 6474-81.
- Shimizu, K., M. Tani, et al. (1999). "The autocrine motility factor receptor gene encodes a novel type of seven transmembrane protein." FEBS Letters **456**: 295-300.
- Shoreibah, M., G. S. Perng, et al. (1993). "Isolation, characterization, and expression of a cDNA encoding N-acetylglucosaminyltransferase V." J Biol Chem **268**(21): 15381-5.
- Silletti, S., S. Paku, et al. (1996). "Tumor autocrine motility factor responses are mediated through cell contact and focal adhesion rearrangement in the absence of new tyrosine phosphorylation in metastatic cells." American Journal of Pathology **148**: 1649-1660.
- Silletti, S., S. Paku, et al. (1998). "Autocrine motility factor and the extracellular matrix. I. Coordinate regulation of melanoma cell adhesion, spreading and migration involves focal contact reorganization." International Journal of Cancer **76**: 120-128.

- Silletti, S., S. Paku, et al. (1998). "Autocrine motility factor and the extracellular matrix. II. Degradation or remodeling of substratum components directs the motile response of tumor cells." International Journal of Cancer **76**: 129-35.
- Silletti, S. and A. Raz (1993). "Autocrine motility factor is a growth factor." Biochemical and Biophysical Research Communications **194**: 446-457.
- Silletti, S., J. Timar, et al. (1994). "Autocrine motility factor induces differential 12-lipoxygenase expression and activity in high and low-metastatic K1735 melanoma cell variants." Cancer Research **54**: 5752-6.
- Silletti, S., H. Watanabe, et al. (1991). "Purification of B16-F1 melanoma autocrine motility factor and its receptor." Cancer Res **51**(13): 3507-11.
- Simard, D. and I. R. Nabi (1996). "Inverse relation of autocrine motility factor receptor and E-cadherin expression following transformation of epithelial MDCK cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **219**: 122-127.
- Soengas, M. S., P. Capodieci, et al. (2001). "Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma." Nature **409**(6817): 207-11.
- Sonoda, Y., Y. Matsumoto, et al. (2000). "Anti-apoptotic role of focal adhesion kinase (FAK). Induction of inhibitor-of-apoptosis proteins and apoptosis suppression

- by the overexpression of FAK in a human leukemic cell line, HL-60." J Biol Chem **275**(21): 16309-15.
- Sottile, J., D. Hocking, et al. (2000). "Fibronectin polymerization stimulates cell growth by RGD-dependent and -independent mechanisms." J Cell Sci **113**(23): 4287-99.
- Stetler-Stevenson, W. G., L. A. Liotta, et al. (1993). "Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis." Faseb J **7**(15): 1434-41.
- Su, Z. Z., J. Lin, et al. (1996). "Surface-epitope masking and expression cloning identifies the human prostate carcinoma tumor antigen gene PCTA-1 a member of the galectin gene family." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(14): 7252-7.
- Sun, Y. J., C. C. Chou, et al. (1999). "The crystal structure of a multifunctional protein: phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin." Proceedings of the National Academy of Science **96**(10): 5412-7.
- SundarRaj, N., D. Fite, et al. (1995). "Perlecan is a component of cartilage matrix and promotes chondrocyte attachment." J Cell Sci **108 (Pt 7)**: 2663-72.
- Szeinfeld, D. (1989). "Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in CaNT tumours of different volume and response to tumour clamping and X-irradiation." Strahlenther Onkol **165**(12): 866-9.

- Takagi, J., H. P. Erickson, et al. (2001). "C-terminal opening mimics 'inside-out' activation of integrin alpha5beta1." Nat Struct Biol **8**(5): 412-6.
- Takagi, J., B. M. Petre, et al. (2002). "Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling." Cell **110**(5): 599-11.
- Takanami, I., K. Takeuchi, et al. (1998). "Autocrine motility factor in pulmonary adenocarcinomas: results of an immunohistochemical study." Tumour Biol **19**(5): 384-9.
- Takanami, I., K. Takeuchi, et al. (2002). "Autocrine motility factor receptor gene expression and cell motility in lung cancer cell lines." Oncol Rep **9**(1): 125-8.
- Takanami, I., K. Takeuchi, et al. (2001). "Significance of autocrine motility factor receptor gene expression as a prognostic factor in non-small-cell lung cancer." Int J Cancer **95**(6): 384-7.
- Takano, R., M. Nose, et al. (1990). "Increase of beta 1-6-branched oligosaccharides in human esophageal carcinomas invasive against surrounding tissue in vivo and in vitro." Am J Pathol **137**(5): 1007-11.
- Takenaka, Y., T. Fukumori, et al. (2004). "Galectin-3 and metastasis." Glycoconj J **19**(7-9): 543-9.

- Takizawa, P. A., J. K. Yucel, et al. (1993). "Complete vesiculation of Golgi membranes and inhibition of protein transport by a novel sea sponge metabolite, ilimaquinone." Cell **73**(6): 1079-90.
- Tanaka, N., A. Haga, et al. (2002). "Inhibition mechanism of cytokine activity of human autocrine motility factor examined by crystal structure analyses and site-directed mutagenesis studies." J Mol Biol **318**(4): 985-97.
- Taniguchi, K., Y. Yonemura, et al. (1998). "The relation between the growth patterns of gastric carcinoma and the expression of hepatocyte growth factor receptor (c-met), autocrine motility factor receptor, and urokinase-type plasminogen activator receptor." Cancer **82**(11): 2112-22.
- Tarantini, F., S. Gamble, et al. (1995). "The cysteine residue responsible for the release of fibroblast growth factor-1 residues in a domain independent of the domain for phosphatidylserine binding." J Biol Chem **270**(49): 29039-42.
- Taverna, D., M. Ullman-Cullere, et al. (1998). "A test of the role of alpha5 integrin/fibronectin interactions in tumorigenesis." Cancer Res **58**(4): 848-53.
- ter Kuile, B. H. (1999). "Regulation and adaptation of glucose metabolism of the parasitic protist *Leishmania donovani* at the enzyme and mRNA levels." J Bacteriol **181**(16): 4863-72.

- Timar, J., S. Silletti, et al. (1993). "Regulation of melanoma cell motility by the lipoxygenase metabolite 12(S)-HETE¹." Int. J. Cancer **55**: 1003-10.
- Timar, J., M. Trikha, et al. (1996). "Autocrine motility factor signals integrin-mediated metastatic melanoma cell adhesion and invasion." Cancer Research **56**: 1902-8.
- Tkachenko, E. and M. Simons (2002). "Clustering induces redistribution of syndecan-4 core protein into raft membrane domains." J Biol Chem **277**(22): 19946-51.
- Torimura, T., T. Ueno, et al. (2001). "Autocrine motility factor enhances hepatoma cell invasion across the basement membrane through activation of beta1 integrins." Hepatology **34**(1): 62-71.
- Treuhart, P. S. and M. C. DJ (1971). "Synovial fluid pH, lactate, oxygen and carbon dioxide partial pressure in various joint diseases." Arthritis Rheum **14**(4): 475-84.
- Tsutsumi, S., S. K. Gupta, et al. (2002). "Activation of small GTPase Rho is required for autocrine motility factor signaling." Cancer Res **62**(15): 4484-90.
- Tsutsumi, S., S. K. Gupta, et al. (2003). "The enzymatic activity of phosphoglucose isomerase is not required for its cytokine function." FEBS Lett **534**(1-3): 49-53.

- Tsutsumi, S., V. Hogan, et al. (2003). "Overexpression of the autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase induces transformation and survival of NIH-3T3 fibroblasts." Cancer Res **63**(1): 242-9.
- Turna, A., O. Solak, et al. (2004). "Lactate dehydrogenase levels predict pulmonary morbidity after lung resection for non-small cell lung cancer." Eur J Cardiothorac Surg **26**(3): 483-7.
- Turnbull, J., A. Powell, et al. (2001). "Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator." Trends Cell Biol **11**(2): 75-82.
- Turner, C. E. (2000). "Paxillin and focal adhesion signalling." Nat Cell Biol **2**(12): E231-6.
- Vaheri, A. and E. Ruoslahti (1975). "Fibroblast surface antigen produced but not retained by virus-transformed human cells." J Exp Med **142**(2): 530-5.
- Van Den Brule, F., S. Califice, et al. (2002). "Expression of galectins in cancer: A critical review." Glycoconj J **19**(7-9): 537-42.
- van der Bliek, A. M., T. E. Redelmeier, et al. (1993). "Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation." J Cell Biol **122**(3): 553-63.

- Varner, J. A., D. A. Emerson, et al. (1995). "Integrin alpha 5 beta 1 expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin." Mol Biol Cell **6**(6): 725-40.
- Veikkola, T., M. Karkkainen, et al. (2000). "Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors." Cancer Res **60**(2): 203-12.
- Verbeek, B. S., T. M. Vroom, et al. (1996). "c-Src protein expression is increased in human breast cancer. An immunohistochemical and biochemical analysis." J Pathol **180**(4): 383-8.
- Vlodavsky, I., R. Bar-Shavit, et al. (1991). "Extracellular sequestration and release of fibroblast growth factor: a regulatory mechanism?" Trends Biochem Sci **16**(7): 268-71.
- Vlodavsky, I., O. Goldshmidt, et al. (2001). "Molecular properties and involvement of heparanase in cancer progression and normal development." Biochimie **83**(8): 831-9.
- Vlodavsky, I., H. Q. Miao, et al. (1996). "Involvement of heparan sulfate and related molecules in sequestration and growth promoting activity of fibroblast growth factor." Cancer Metastasis Rev **15**(2): 177-86.
- von Zastrow, M. (2001). "Role of endocytosis in signalling and regulation of G-protein-coupled receptors." Biochem Soc Trans **29**(Pt 4): 500-4.

- Voura, E. B., M. Sandig, et al. (1998). "Cell-cell interactions during transendothelial migration of tumor cells." Microsc Res Tech **43**(3): 265-75.
- Vuori, K., H. Hirai, et al. (1996). "Introduction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family kinases." Mol Cell Biol **16**(6): 2606-13.
- Vyakarnam, A., A. J. Lenneman, et al. (1998). "A comparative nuclear localization study of galectin-1 with other splicing components." Exp Cell Res **242**(2): 419-28.
- Walter, P., R. Gilmore, et al. (1984). "Protein translocation across the endoplasmic reticulum." Cell **38**(1): 5-8.
- Wang, H.-J., N. Benlimame, et al. (1997). "The AMF-R tubule is a smooth ilimaquinone-sensitive subdomain of the endoplasmic reticulum." Journal of Cell Science **110**: 3043-3053.
- Wang, H.-J., G. Guay, et al. (2000). "Calcium regulates the association between mitochondria and a smooth subdomain of the endoplasmic reticulum." J. Cell Biol. **150**(6): 1489-98.
- Wang, J., K. Lim, et al. (1998). "Atomic structure of an alphabeta T cell receptor (TCR) heterodimer in complex with an anti-TCR fab fragment derived from a mitogenic antibody." Embo J **17**(1): 10-26.

- Wang, J., A. J. Morris, et al. (1996). "The molecular nature of the F-actin binding activity of aldolase revealed with site-directed mutants." Journal of Biological Chemistry **271**(12): 6861-5.
- Wang, Y., J. Tan, et al. (2001). "Modeling human congenital disorder of glycosylation type IIa in the mouse: conservation of asparagine-linked glycan-dependent functions in mammalian physiology and insights into disease pathogenesis." Glycobiology **11**(12): 1051-70.
- Warfield, P. R., P. N. Makker, et al. (1997). "Adhesion of human breast carcinoma to extracellular matrix proteins is modulated by galectin-3." Invasion Metastasis **17**(2): 101-12.
- Watanabe, H., P. Carmi, et al. (1991). "Purification of human tumor cell autocrine motility factor and molecular cloning of its receptor." Journal of Biological Chemistry **266**: 13442-13448.
- Watanabe, H., K. Takehana, et al. (1996). "Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide." Cancer Res **56**(13): 2960-3.
- Watt, D. J., G. E. Jones, et al. (2004). "The involvement of galectin-1 in skeletal muscle determination, differentiation and regeneration." Glycoconj J **19**(7-9): 615-9.

- Webster, M. A., J. N. Hutchinson, et al. (1998). "Requirement for both Shc and phosphatidylinositol 3' kinase signaling pathways in polyomavirus middle T-mediated mammary tumorigenesis." Mol Cell Biol **18**(4): 2344-59.
- Weible, M. W., 2nd and I. A. Hendry (2004). "What is the importance of multivesicular bodies in retrograde axonal transport in vivo?" J Neurobiol **58**(2): 230-43.
- Weissman, A. M. (2001). "Themes and variations on ubiquitylation." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(3): 169-78.
- Welsh, S. J. and G. Powis (2003). "Hypoxia inducible factor as a cancer drug target." Curr Cancer Drug Targets **3**(6): 391-405.
- Wennerberg, K., L. Lohikangas, et al. (1996). "Beta 1 integrin-dependent and -independent polymerization of fibronectin." J Cell Biol **132**(1-2): 227-38.
- Whitman, M., D. R. Kaplan, et al. (1985). "Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation." Nature **315**(6016): 239-42.
- Wiertz, E. J., D. Tortorella, et al. (1996). "Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction." Nature **384**(6608): 432-8.

Wierzbicka-Patynowski, I. and J. E. Schwarzbauer (2002). "Regulatory role for SRC and phosphatidylinositol 3-kinase in initiation of fibronectin matrix assembly." J Biol Chem **277**(22): 19703-8.

Wierzbicka-Patynowski, I. and J. E. Schwarzbauer (2003). "The ins and outs of fibronectin matrix assembly." J Cell Sci **116**(Pt 16): 3269-76.

Wight, T. N. (2002). "Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology." Curr Opin Cell Biol **14**(5): 617-23.

Wike-Hooley, J. L., J. Haveman, et al. (1984). "The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease." Radiother Oncol **2**(4): 343-66.

Wike-Hooley, J. L., J. Van der Zee, et al. (1984). "Human tumour pH changes following hyperthermia and radiation therapy." Eur J Cancer Clin Oncol **20**(5): 619-23.

Wilcox-Adelman, S. A., F. Denhez, et al. (2002). "Syndecan-4 modulates focal adhesion kinase phosphorylation." J Biol Chem **277**(36): 32970-7.

Williams, B. R., R. A. Gelman, et al. (1978). "Collagen fibril formation. Optimal in vitro conditions and preliminary kinetic results." J Biol Chem **253**(18): 6578-85.

- Wilson, T. J., M. N. Firth, et al. (1989). "The sequence of the mouse 14 kDa beta-galactoside-binding lectin and evidence for its synthesis on free cytoplasmic ribosomes." Biochem J **261**(3): 847-52.
- Wipke, B. T., Z. Wang, et al. (2002). "Dynamic visualization of a joint-specific autoimmune response through positron emission tomography." Nat Immunol **3**(4): 366-72.
- Wojcikiewicz, R. J. (2004). "Regulated ubiquitination of proteins in GPCR-initiated signaling pathways." Trends Pharmacol Sci **25**(1): 35-41.
- Woo, H. J., L. M. Shaw, et al. (1990). "The major non-integrin laminin binding protein of macrophages is identical to carbohydrate binding protein 35 (Mac-2)." J Biol Chem **265**(13): 7097-9.
- Woods, A. and J. R. Couchman (1994). "Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component." Mol Biol Cell **5**(2): 183-92.
- Woods, A. and J. R. Couchman (2001). "Syndecan-4 and focal adhesion function." Curr Opin Cell Biol **13**(5): 578-83.
- Woodside, D. G., S. Liu, et al. (2001). "Integrin activation." Thromb Haemost **86**(1): 316-23.

- Wu, C., J. S. Bauer, et al. (1993). "The alpha 5 beta 1 integrin fibronectin receptor, but not the alpha 5 cytoplasmic domain, functions in an early and essential step in fibronectin matrix assembly." J Biol Chem **268**(29): 21883-8.
- Wu, C., P. E. Hughes, et al. (1996). "Identification of a new biological function for the integrin alpha v beta 3: initiation of fibronectin matrix assembly." Cell Adhes Commun **4**(3): 149-58.
- Wu, C., S. Y. Keightley, et al. (1998). "Integrin-linked protein kinase regulates fibronectin matrix assembly, E-cadherin expression, and tumorigenicity." J Biol Chem **273**(1): 528-36.
- Wu, C., V. M. Keivens, et al. (1995). "Integrin activation and cytoskeletal interaction are essential for the assembly of a fibronectin matrix." Cell **83**(5): 715-24.
- Wu, Y., L. Chen, et al. (2002). "beta 1-Integrin-mediated glioma cell adhesion and free radical-induced apoptosis are regulated by binding to a C-terminal domain of PG-M/versican." J Biol Chem **277**(14): 12294-301.
- Xing, Z., H. C. Chen, et al. (1994). "Direct interaction of v-Src with the focal adhesion kinase mediated by the Src SH2 domain." Mol Biol Cell **5**(4): 413-21.
- Xiong, J. P., T. Stehle, et al. (2001). "Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3." Science **294**(5541): 339-45.

- Xiong, J. P., T. Stehle, et al. (2002). "Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand." Science **296**(5565): 151-5.
- Xu, W. and J. W. Chiao (1996). "Biochemical characteristics of a human myeloid leukemia cell differentiation factor." Prep Biochem Biotechnol **26**(1): 21-30.
- Xu, W., K. Seiter, et al. (1996). "The differentiation and maturation mediator for human myeloid leukemia cells shares homology with neuroleukin or phosphoglucose isomerase." Blood **87**: 4502-6.
- Yakirevich, E. and Y. Naot (2000). "Cloning of a glucose phosphate isomerase/neuroleukin-like sperm antigen involved in sperm agglutination." Biol Reprod **62**(4): 1016-23.
- Yamada, K. M. and S. Miyamoto (1995). "Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control." Curr Opin Cell Biol **7**(5): 681-9.
- Yamaguchi, Y., D. M. Mann, et al. (1990). "Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin." Nature **346**(6281): 281-4.
- Yamashita, K., T. Ohkura, et al. (1984). "Comparative study of the oligosaccharides released from baby hamster kidney cells and their polyoma transformant by hydrazinolysis." J Biol Chem **259**(17): 10834-40.

- Yanagawa, T., H. Watanabe, et al. (2004). "Overexpression of autocrine motility factor in metastatic tumor cells: possible association with augmented expression of KIF3A and GDI-beta." Lab Invest **84**(4): 513-22.
- Yang, J. T., H. Rayburn, et al. (1993). "Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice." Development **119**(4): 1093-105.
- Yang, R. Y., P. N. Hill, et al. (1998). "Role of the carboxyl-terminal lectin domain in self-association of galectin-3." Biochemistry **37**(12): 4086-92.
- Yang, R. Y., D. K. Hsu, et al. (2001). "Cell cycle regulation by galectin-12, a new member of the galectin superfamily." J Biol Chem **276**(23): 20252-60.
- Yang, Y. W., M. Yanagishita, et al. (1996). "Heparin inhibition of insulin-like growth factor-binding protein-3 binding to human fibroblasts and rat glioma cells: role of heparan sulfate proteoglycans." Endocrinology **137**(10): 4363-71.
- Yoneda, A. and J. R. Couchman (2003). "Regulation of cytoskeletal organization by syndecan transmembrane proteoglycans." Matrix Biol **22**(1): 25-33.
- Yoon, D. Y., P. Buchler, et al. (2001). "Identification of genes differentially induced by hypoxia in pancreatic cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **288**(4): 882-6.

- Yousefi, S., E. Higgins, et al. (1991). "Increased UDP-GlcNAc:Gal beta 1-3GalNAc-R (GlcNAc to GalNAc) beta-1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase activity in metastatic murine tumor cell lines. Control of polylactosamine synthesis." J Biol Chem **266**(3): 1772-82.
- Yu, F. L., M. H. Liao, et al. (2004). "Induction of hepatoma cells migration by phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor through the upregulation of matrix metalloproteinase-3." Biochem Biophys Res Commun **314**(1): 76-82.
- Zaidel-Bar, R., C. Ballestrem, et al. (2003). "Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells." J Cell Sci **116**(Pt 22): 4605-13.
- Zamir, E. and B. Geiger (2001). "Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions." J Cell Sci **114**(Pt 20): 3583-90.
- Zamir, E., B. Z. Katz, et al. (1999). "Molecular diversity of cell-matrix adhesions." J Cell Sci **112** (Pt 11): 1655-69.
- Zamir, E., M. Katz, et al. (2000). "Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts." Nat Cell Biol **2**(4): 191-6.
- Zeimet, A. G., C. Natoli, et al. (1996). "Circulating immunostimulatory protein 90K and soluble interleukin-2-receptor in human ovarian cancer." Int J Cancer **68**(1): 34-8.

- Zhang, Q., W. J. Checovich, et al. (1994). "Modulation of cell surface fibronectin assembly sites by lysophosphatidic acid." J Cell Biol **127**(5): 1447-59.
- Zhang, Q., M. K. Magnusson, et al. (1997). "Lysophosphatidic acid and microtubule-destabilizing agents stimulate fibronectin matrix assembly through Rho-dependent actin stress fiber formation and cell contraction." Mol Biol Cell **8**(8): 1415-25.
- Zhang, Y., L. Cao, et al. (1998). "The G3 domain of versican enhances cell proliferation via epidermal growth factor-like motifs." J Biol Chem **273**(33): 21342-51.
- Zhang, Z., A. O. Morla, et al. (1993). "The alpha v beta 1 integrin functions as a fibronectin receptor but does not support fibronectin matrix assembly and cell migration on fibronectin." J Cell Biol **122**(1): 235-42.
- Zhong, C., M. Chrzanowska-Wodnicka, et al. (1998). "Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly." J Cell Biol **141**(2): 539-51.
- Zick, Y., M. Eisenstein, et al. (2004). "Role of galectin-8 as a modulator of cell adhesion and cell growth." Glycoconj J **19**(7-9): 517-26.

Zimmerman, B., T. Volberg, et al. (2004). "Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading." Cell Motil Cytoskeleton **58**(3): 143-59.

Zu, X. L. and M. Guppy (2004). "Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction." Biochem Biophys Res Commun **313**(3): 459-65.

PUBLICATIONS

Lagana A, E Partridge, J Goetz, A Raz, JW Dennis, and IR Nabi. *Galectin-3 mediated, RGD-independent fibronectin fibrillogenesis is dependent on Mgat5 expression*. En rédaction.

Partridge E, S Nim, **A Lagana**, G Guay, Y Altschuler, JW Dennis* and IR Nabi*. *Regulation of Caveolin-1 Function by Mgat5 Expression*. En rédaction.

Lagana A, Y Altschuler, and IR Nabi. *The complex biology of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor/neuroleukin: pH specific mechanisms of sequestration by matrix fibronectin and heparan sulphate*. Soumis.

Lagana A, T Duchaine, A Raz, L Desgroseillers, and IR Nabi. *Expression of Autocrine Motility Factor/Phosphohexose Isomerase in Cos 7 Cells*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 273, 213-218 (2000).

PU Le, N Benlimame, **A Lagana**, A Raz and IR Nabi. *Clathrin-mediated endocytosis and recycling of autocrine motility factor receptor to fibronectin fibrils is a limiting factor for NIH-3T3 cell motility*. J. Cell. Sci. 113, 3227-3240 (2000).

Lagana A, J Vadnais, PU Le, T Nguyen, R Laprade, IR Nabi et J Noël. *Regulation of the formation of tumor cell pseudopodia by Na^+/H^+ exchanger NHE1*. J. Cell. Sci. 113:3649-62 (2000).

